



INSTITUTO POLITÉCNICO
DE VIANA DO CASTELO

Ana Rita Pereira Martins

Biodiversidade e hipovirulência de *Cryphonectria parasitica* na
Região do Entre Douro e Minho: implicações para o controlo
biológico do cancro do castanheiro

Mestrado em Agricultura Biológica

Trabalho efetuado sob a orientação da:

Professora Doutora Maria Luísa Moura

Professora Doutora Maria Eugénia Madureira Gouveia

Novembro de 2019

**As doutrinas expressas neste
trabalho são da exclusiva
responsabilidade do autor.**

Índice

Agradecimentos	iii
Resumo	iv
Abstrat.....	vi
Lista de Abreviaturas	viii
Lista de Quadros	ix
Lista de Figuras	x
1. Introdução.....	1
1.1 O castanheiro	2
1.1.1 Origem e descrição botânica	2
1.1.2 Distribuição geográfica	3
1.1.3 Importância económica.....	4
1.2 O cancro do castanheiro	5
1.2.1 Origem e dispersão da doença.....	5
1.2.2 Sintomatologia da doença.....	7
1.2.3 <i>Cryphonectria parasitica</i>	8
1.3 Hipovirulência	10
1.3.1 Tipos de hypovírus de <i>C. parasitica</i>	12
1.3.2 Disseminação do hypovírus	12
1.3.3 Mecanismo de infeção do vírus	13
1.3.4 Incompatibilidade vegetativa	14
1.4 Meios de luta do cancro do castanheiro	16
1.4.1 Hipovirulência natural.....	17
1.4.2 Hipovirulência como meio de luta contra o cancro do castanheiro	17
1.4.3 Fatores epidemiológicos que afetam a virulência	18
1.5 Objetivos	18
2. Materiais e métodos	20
2.1 Localização dos soutos estudados e avaliação da severidade da doença	20
2.2 Recolha de material vegetal infetado	21
2.3 Isolamento e caracterização de estirpes de <i>C. parasitica</i>.....	22
2.4 Determinação dos grupos de compatibilidade vegetativa (VCtypes)	24
2.5 Identificação molecular dos isolados hipovirulentos.....	25

2.5.1 Extração de DNA.....	25
2.5.2 Amplificação PCR.....	25
2.5.3 Visualização dos fragmentos amplificados.....	26
2.6 Detecção e identificação molecular do hypovírus (CHV1)	27
2.6.1 Extração de RNA.....	27
2.6.2 Identificação do vírus CHV1	28
2.7 Caracterização metabólica dos isolados de <i>C. parasitica</i>	29
2.7.1. Preparação de suspensão de esporos	29
2.8 Análise estatística	31
3. Resultados	32
3.1 Incidência do cancro do castanheiro nos soutos em estudo	32
3.2 Georreferenciação e avaliação da severidade da doença.....	34
3.2.1 Souto de Crasto, Ponte da Barca	34
3.2.2 Souto de Oleiros, Ponte da Barca	35
3.2.3 Souto de Cendufe, Arcos de Valdevez	37
3.2.4 Souto de Cepões, Ponte de Lima	38
3.3 Identificação e caracterização dos isolados de <i>C. parasitica</i>	40
3.4 Determinação dos grupos de compatibilidade vegetativa.....	45
3.5 Identificação molecular dos isolados hipovirulentos.....	48
3.6 Microplacas BIOLOG: caracterização de perfis metabólicos.....	50
4. Discussão	55
5. Conclusão	59
6. Referências bibliográficas.....	60

Agradecimentos

A realização deste trabalho foi possível graças à colaboração de várias pessoas e instituições que, de diferentes formas, contribuíram para a elaboração desta tese, e às quais quero agradecer.

À Professora Luísa Moura, gostaria em primeiro lugar de agradecer por ter aceitado ser minha orientadora. Agradecer pela partilha de conhecimentos, pelo apoio, incentivo e conselhos que me ajudaram a terminar este trabalho.

À Professora Eugénia Gouveia, o meu agradecimento pela orientação, pelo apoio prestado ao longo do trabalho e permanente disponibilidade para ajudar.

Ao meu colega de trabalho, Fernando Santos pelos conselhos e ajuda na realização do trabalho prático e colaboração na análise estatística.

A todos os professores e colegas do mestrado de Agricultura Biológica pelo apoio e partilha de conhecimento que tornaram estes dois anos uma experiência tão enriquecedora.

Aos funcionários do laboratório da ESAPL, Engenheiro Vergílio Peixoto, D. Maria Gonçalves, D. Susy Marinho e D. Maria Helena pela constante disponibilidade e ajuda no trabalho de laboratório.

A todos os produtores e proprietários das explorações que integraram este estudo, sem os quais não teria sido possível a realização do trabalho prático.

Aos meus pais, Maria Augusta Novo e José Martins, por todo o apoio, paciência e esforço que fizeram para que isto fosse possível.

À minha irmã, Joana Martins, pela paciência e apoio ao longo do trabalho.

À minha avó, Maria do Rosário Pereira, pelo apoio e por me ouvir.

A todos que de alguma forma contribuíram e me ajudaram na realização deste trabalho gostaria de deixar o meu mais sincero agradecimento.

Resumo

O cancro do castanheiro causado por *Cryphonectria parasitica*, afeta severamente o castanheiro europeu (*Castanea sativa*) provocando elevados prejuízos em todo o setor da castanha e do castanheiro em Portugal. O controlo desta doença tem sido difícil devido à ausência de tratamentos eficazes. A luta biológica por hipovirulência tem demonstrado bons resultados no tratamento da doença, através da disseminação de *Cryphonectria Hypovirus 1* (CHV1), presente nas estirpes hipovirulentas. Contudo, é necessário que se conheça previamente a estrutura populacional de *C. parasitica* e que se identifiquem os grupos de compatibilidade vegetativa (VCtypes) presentes em cada souto.

O objetivo deste trabalho foi isolar e estudar as características biológicas da população de *C. parasitica* e de possíveis estirpes hipovirulentas, presente em 4 soutos da região do Entre Douro e Minho, localizados em Ponte de Lima, Ponte da Barca e Arcos de Valdevez. O estudo da diversidade e da prevalência das populações de *C. parasitica* no Minho, e a deteção e identificação do vírus CHV1 será determinante para avaliar a possibilidade de aplicação de estirpes hipovirulentas como meio de luta preferencial contra a doença no Minho. Foi realizada uma amostragem para a recolha de material em cancos virulentos e em cancos curados e avaliado o grau de severidade da doença em 2018 e 2019. Todos os soutos apresentavam sintomas de cancro, mas também se observou a existência de muitos cancos curados. Os soutos mais afetados pela doença foram o de Oleiros (Ponte da Barca) e o de Cepões (Ponte de Lima). O souto de Cendufe (Arcos de Valdevez) apresentava metade das árvores amostradas com cancos curados por hipovirulência natural. Apesar de se terem observado muitos cancos curados, não se conseguiu em laboratório isolar estirpes hipovirulentas e a pesquisa de hipovírus (CHV1) não foi possível. Os isolados virulentos de *C. parasitica* obtidos foram caracterizados morfológicamente, demonstrando uma grande variabilidade quanto à forma de crescimento e coloração do micélio. A maioria dos isolados apresentava crescimento regular e coloração laranja do micélio. A determinação de VCtypes de *C. parasitica* dos isolados obtidos, por paramento com cinco isolados europeus de referência (EU01, EU02, EU11, EU12 e EU66) considerados os mais frequentes em Portugal, mostrou a existência dos 5 VCtypes. O VCtype mais representativo nos soutos do Minho estudados em 2018/2019 é o EU11 (48%), seguido do EU01 (11%). EU12, EU02 e EU 66 têm baixa representatividade, respetivamente de 6%, 5% e 3% dos isolados. Contudo,

27% do total dos isolados obtidos não foram incluídos em nenhum dos 5 grupos europeus testados. Depois do paramento entre estes isolados foram detetados pelo menos 12 VCtypes diferentes, o que indica que a diversidade de VCtypes é muito elevada no Minho, o que pode constituir um obstáculo à introdução da hipovirulência como meio de luta biológica para tratamento de cancos. Os soutos de Cendufe e Oleiros apresentam baixa diversidade populacional, sendo que, a maior percentagem dos isolados pertencem ao grupo EU11, 82% e 79% respetivamente. Nos soutos de Castro e Cepões verificou-se uma elevada percentagem de isolados que não foram incluídos em nenhum grupo de compatibilidade em estudo, 54% e 43% respetivamente. Em Castro, o grupo de compatibilidade mais significativo foi o EU01 (20%) e em Cepões foi o grupo EU11 (23%). A caracterização metabólica de isolados virulentos e hipovirulentos *C. parasitica* usando microplacas Biolog FF permitiu avaliar os perfis metabólicos da utilização de 95 fontes de carbono diferentes. Os resultados mostraram que à exceção do isolado virulento EU01 todos os restantes isolados virulentos apresentaram maior intensidade na utilização de compostos, relativamente aos isolados hipovirulentos. De uma maneira geral, os hidratos de carbono foram os compostos mais utilizados por todas as estirpes.

O estudo da estrutura populacional de *C. parasitica* é fundamental para compreender os fatores que determinaram a sua presença e dispersão, bem como contribuir para tornar a hipovirulência um meio de luta biológica eficaz no controlo da doença noutras regiões. Os resultados obtidos indicam a necessidade de estudos mais aprofundados essenciais para a compreensão dos fatores e mecanismos associados à dispersão natural de hipovírus nos soutos, nas condições de produção do Minho.

Palavras-chave: Castanheiro, *Cryphonectia Hypovirus* 1 (CHV1), *Cryphonectria parasitica*, VCtypes

Abstract

Chestnut blight caused by *Cryphonectria parasitica* severely affects the European chestnut tree (*Castanea sativa*) causing high damage to the chestnut sector in Portugal. The control of this disease has been difficult due to the absence of effective treatments. The biological control by hypovirulence has shown good results to control the disease through the spread of *Cryphonectria Hypovirus* 1 (CHV1), present in the hypovirulent strains. However, it is necessary to know the population structure of *C. parasitica* and to identify the vegetative compatibility groups (VCtypes) present in each grove. The aim of this work was to isolate and study the biological characteristics of the *C. parasitica* population and possible hypovirulent strains present in 4 chestnut areas of Entre Douro e Minho region, located in Ponte de Lima, Ponte da Barca and Arcos de Valdevez. The study of the diversity and prevalence of *C. parasitica* populations in Minho, and the detection and identification of the CHV1 virus will be determinant to evaluate the possibility of application of hypovirulent strains as a preferential means of control against chestnut blight in Minho. Sampling was performed in virulent and healed cankers and the severity of the disease was assessed in 2018 and 2019. All groves had virulent cankers symptoms, but there was also many healed cankers. The groves most affected by the disease were Oleiros (Ponte da Barca) and Cepões (Ponte de Lima). The grove of Cendufe (Arcos de Valdevez) had half of the trees with healed cankers by natural hypovirulence. Although many healed cankers were observed, it was not possible in the laboratory to isolate hypovirulent strains and the search for hypoviruses (CHV1) was not possible. The virulent *C. parasitica* isolates were characterized morphologically, showing a high variability regarding form of growth and coloration of mycelium. Most isolates presented regular growth and orange mycelium coloration. The determination of *C. parasitica* VCtypes of the isolates obtained by pairing with five European reference isolates (EU01, EU02, EU11, EU12 and EU66) considered the most frequent in Portugal, showed the existence of the 5 VCtypes. The most representative VCtype in the Minho chestnut areas studied in 2018/2019 is EU11 (48%), followed by EU01 (11%). EU12, EU02 and EU 66 have low representativeness respectively of 6%, 5% and 3% of isolates. However, 27% of the total isolates obtained were not included in any of the 5 European groups tested. After cross pairing of these isolates, at least 12 different VCtypes have been detected, which indicates great diversity of VCtypes in Minho and, may constitute an obstacle to the introduction of

hypovirus as a biological means of canker treatment. The groves of Cendufe and Oleiros have low population diversity and highest percentage of isolates belongs to the EU11 VCTYPE, 82% and 79% respectively. In the groves of Castro and Cepões, there was a high percentage of isolates that were not included in any compatibility group under study, 54% and 43% respectively. In Castro, the most significant compatibility group was EU01 (20%) and in Cepões was the EU11 (23%). The metabolic characterization of virulent and hypovirulent *C. parasitica* isolates using Biolog FF microplates allowed to evaluate the metabolic profiles of the use of 95 different carbon sources. The results showed that with the exception of the virulent isolate EU01 all other virulent isolates presented higher intensity in the use of compounds compared to the hypovirulent isolates. In general, carbohydrates were the most used compounds by all strains. The study of the population structure of *C. parasitica* is essential to understand the factors that determined its presence and dispersion, as well as contribute to make hypovirulence an effective biological control of the disease in other regions. The results obtained indicate the need for further studies are essential to understanding the factors and mechanisms associated with the natural dispersion of hypoviruses in the chestnut areas under the conditions of Minho production.

Keywords: Chestnut tree, *Cryphonectia Hypovirus 1* (CHV1), *Cryphonectria parasitica*, VCTypes

Lista de Abreviaturas

AWCD - Average well color development

CHV- *Cryphonectria hypovirus*

GCV - Grupos de Compatibilidade Vegetativa

INE - Instituto Nacional de Estatística

PCR- Polymerase Chain Reaction

PDA - Potato Dextrose Agar

RNA - Ácido ribonucleico

Lista de Quadros

Quadro 1. Classificação taxonómica do castanheiro europeu.....	2
Quadro 2. Superfície de produção de castanha e respetiva produção em Portugal (INE, 2016).....	5
Quadro 3. Escala de classificação do grau de severidade do cancro do castanheiro.....	20
Quadro 4. Isolados de <i>C. parasitica</i> utilizados na caracterização do crescimento micelial..	24
Quadro 5. Isolados de <i>C. parasitica</i> utilizados na caracterização metabólica através de Microplacas Biolog FF.....	29
Quadro 6. Isolados selecionados como possíveis estirpes hipovirulentas de <i>C. parasitica</i> , obtidos nos soutos quatro soutos em estudo.....	49
Quadro 7. Identificação de isolados a partir da sequência nucleotídica da região ITS.....	50
Quadro 8. Componentes principais: Eigenvalue e variância.....	54

Lista de Figuras

Figura 1. Distribuição da espécie <i>Castanea sativa</i> Mill. em Portugal continental (Araújo <i>et al.</i> , 2019).....	4
Figura 2. Mapa da distribuição mundial de <i>Cryphonectria parasitica</i> em Outubro de 2019 (EPPO, 2019).....	6
Figura 3. Sintomas do cancro do castanheiro em <i>Castanea sativa</i> (ramos mortos; fendilhamento da casca; coloração avermelhada do cancro).....	8
Figura 4. Ciclo de vida de <i>Cryphonectria parasitica</i> (Adaptado de Heiniger, 1997).....	9
Figura 5. Diferenças morfológicas entre estirpes virulentas e hipovirulentas de <i>Cryphonectria parasitica</i> . A: Cultura de <i>C. parasitica</i> ; B: Cultura de <i>C. parasitica</i> com hipovírus; C: Cancro curado.....	11
Figura 6. Transmissão horizontal do hipovírus por anastomose das hifas em estirpes de <i>C. parasitica</i> (Heiniger, 1997). A: Estirpes compatíveis- verifica-se a formação de uma ligação estável entre as hifas para a transferência do hypovírus. B: Estirpes incompatíveis- não há transferência do hypovírus devido ao estrangulamento das hifas.....	15
Figura 7. Distribuição dos Grupos de Compatibilidade Vegetativa (GCV) do fungo <i>Cryphonectria parasitica</i> em Portugal (Bragança, 2018).....	15
Figura 8. Árvores com cancros amostrados. A: cancro ativo; B: cancro curado.....	21
Figura 9. Recolha de material vegetal contaminado com auxílio de um punch.....	22
Figura 10. Isolamento de <i>C. parasitica</i> em placas de petri com meio PDA a partir das amostras de material vegetal contaminado recolhido nos soutos em estudo. A- Isolamento da madeira infetada em meio PDA. B- Desenvolvimento do micélio do fungo após incubação na estufa. C- Isolado virulento puro.....	23
Figura 11. Estirpes Europeias de referência usadas nos testes de compatibilidade vegetativa (EU-11, EU-02, EU-66, EU-12 e EU-01).....	24
Figura 12. Sintomas do cancro do castanheiro observados nos soutos. A: Fendilhamento e coloração avermelhada da casca; B: Rebentação adventícia exuberante; C: Ramos mortos com permanência das folhas amarelecidas; D: Picnídios.....	33
Figura 13. Cancros curados por hipovirulência natural observados nos soutos em estudo...	33
Figura 14. Vista aérea do souto de Crasto, Ponte da Barca, com os castanheiros estudados assinalados segundo o grau de severidade da doença, 2018.....	34

Figura 15. Severidade do cancro do castanheiro de acordo com escala de severidade de 1 a 5 proposta por Juhásová e Bernadovičová (2001), no souto de Crasto, Ponte da Barca, 2018.....	35
Figura 16. Vista aérea do souto de Oleiros, com os castanheiros amostrados assinalados segundo o grau de severidade da doença, 2018.....	36
Figura 17. Severidade do cancro do castanheiro de acordo com escala de severidade de 1 a 5 proposta por Juhásová e Bernadovičová (2001), no souto de Oleiros, Ponte da Barca, 2018.....	36
Figura 18. Vista aérea do souto de Arcos de Valdevez, com os castanheiros amostrados assinalados segundo o grau de severidade da doença, 2018.....	37
Figura 19. Severidade do cancro do castanheiro de acordo com escala de severidade de 1 a 5 proposta por Juhásová e Bernadovičová (2001), no souto de Cendufe, Arcos de Valdevez, 2018.....	38
Figura 20. Vista aérea do souto de Cepões, com os castanheiros amostrados assinalados segundo o grau de severidade da doença, 2019.....	39
Figura 21. Severidade do cancro do castanheiro de acordo com escala de severidade de 1 a 5 proposta por Juhásová e Bernadovičová (2001), no souto de Cepões, Ponte de Lima, 2019.....	39
Figura 22. Severidade do cancro do castanheiro de acordo com escala de severidade de 1 a 5 proposta por Juhásová e Bernadovičová (2001), nos quatro sotos estudados no Minho em 2018-2019.....	40
Figura 23. Isolados virulentos de <i>C. parasitica</i> com diferentes morfologias de crescimento obtidos a partir de material vegetal recolhido nos sotos de Crasto, Oleiros, Cendufe e Cepões em 2018-2019. A: Crescimento irregular. B: Crescimento regular. C: Isolados com micélio de coloração laranja (C1), castanho (C2) e amarelo (C3).....	41
Figura 24. Isolados com micélio branco e sem formação de esporos, descrito para estirpes hipovirulentas de <i>C. parasitica</i> (2018-2019).....	42
Figura 25. Classificação morfológica do crescimento do micélio dos isolados virulentos de <i>C. parasitica</i> obtidos nos quatro sotos em estudo. A: Crasto, Ponte da Barca; B: Oleiros, Ponte da Barca; C: Cendufe, Arcos de Valdevez; D: Cepões, Ponte de Lima, 2019.....	42
Figura 26. Classificação morfológica da pigmentação do micélio dos isolados virulentos de <i>C. parasitica</i> obtidos nos quatro sotos em estudo. A: Crasto, Ponte da Barca; B: Oleiros, Ponte da Barca; C: Cendufe, Arcos de Valdevez; D: Cepões, Ponte de Lima, 2019.....	43

Figura 27. Crescimento micelial (cm) de isolados de <i>C. parasitica</i> durante 7 dias, a 25° C na ausência de luz.....	44
Figura 28. Diferentes fungos obtidos a partir de madeira infetada com <i>C. parasitica</i>	44
Figura 29. Exemplo de pareamentos entre os isolados de <i>C. parasitica</i> obtidas nos soutos em estudo e as estirpes europeias de referência. A: Estirpes compatíveis. B: Estirpes incompatíveis assinaladas com uma seta.....	45
Figura 30. Percentagem de isolados de <i>C. parasitica</i> em cada grupo de compatibilidade vegetativa no souto de Crasto, Ponte da Barca, 2019.....	46
Figura 31. Percentagem de isolados de <i>C. parasitica</i> em cada grupo de compatibilidade vegetativa no souto de Oleiros, Ponte da Barca, 2019.	46
Figura 32. Percentagem de isolados de <i>C. parasitica</i> em cada grupo de compatibilidade vegetativa no souto de Cendufe, Arcos de Valdevez, 2019.	47
Figura 33. Percentagem de isolados de <i>C. parasitica</i> em cada grupo de compatibilidade vegetativa no souto de Cepões, Ponte de Lima, 2019.	47
Figura 34. Percentagem de VCtypes nos quatro soutos em estudo, 2019.....	48
Figura 35. Gel de agarose apresentando os fragmentos de DNA amplificados com os primers ITS1 e ITS4 de 10 estirpes identificadas como possíveis estirpes hipovirulentas de <i>C. parasitica</i> . 1: A18casca 2-inib2; 2: A 2H-2-4 Inib; 3: A27H-3 Inib; 4: B11V-4; 5:Ol 8v-4.inib; 6: Ol 26v-6-inib; 7: B7V-2; 8: CE 1V-4; 9: Barca 33V-2-1; 10: A15V-3-inib; 1Kb: Marcador molecular.....	49
Figura 36. Valor médio de desenvolvimento da cor, resultante da oxidação de substratos durante a respiração do fungo, ao longo de 192 horas de incubação a 25oC.....	51
Figura 37. Gráfico da utilização de fontes de carbono, por grupos químicos, para os 9 isolados de <i>Cryphonectria parasitica</i> após oito dias de incubação a 25°C.....	52
Figura 38. Mapa de calor da utilização das 95 fontes de carbono pelas nove estirpes de <i>Cryphonectria parasitica</i> , usando MicroPlacas Biolog FF.....	53
Figura 39. Análise dos componentes principais da utilização das fontes de carbono obtida através das Biolog FF MicroPlates para os nove isolados de <i>Cryphonectria parasitica</i> testados.....	54

1. Introdução

O castanheiro (*Castanea sativa* Mill.) tem uma grande importância económica na região norte de Portugal, principalmente devido ao valor da castanha e da madeira de alta qualidade (Borges *et al.*, 2008; Gouveia *et al.*, 2010). O cancro do castanheiro, causado pelo fungo *Cryphonectria parasitica* (Murr.) Barr, foi considerado um dos fatores mais importantes responsável pela elevada mortalidade de *Castanea sativa* em todo o mundo. Este agente patogénico é nativo do leste da Ásia e espalhou-se pelos outros continentes através de castanheiros infetados (Rigling & Prospero, 2018). Introduzido em Portugal em 1989 na região de Trás-os-Montes, esta doença tem vindo a causar perdas na produção e o declínio e morte de muitos castanheiros. Sendo esta uma doença associada à introdução de uma espécie num ambiente ecológico onde não existem antagonistas caracteriza-se em termos epidemiológicos por uma rápida dispersão e elevada agressividade, encontrando-se atualmente, distribuída de forma generalizada pelas regiões produtoras (Peever *et al.*, 2000; Gouveia, 2005; Gouveia *et al.*, 2017). Este fungo faz parte da micoflora natural dos castanheiros asiáticos (*Castanea crenata* Siebold et Zucc. e *Castanea mollissima* Blume) tendo sido levado primeiro para os EUA e mais tarde para a Europa (Gouveia *et al.*, 2016). As tentativas de erradicação da doença por abordagens sanitárias falharam e por vezes pioraram a dispersão da doença devido às frequentes ações de corte que causavam feridas nas árvores e facilitavam a entrada do patógeno. Os métodos de luta químicos, culturais e físicos não se têm mostrado eficazes no controlo da doença, e apenas a hipovirulência, meio de luta biológico, tem demonstrado resultados positivos na Europa. Este meio de luta consiste no uso de isolados de *C. parasitica* que contêm um vírus conhecido como *Cryphonectria hypovirus* 1, CHV1, que reduz a virulência do fungo, permitindo que os castanheiros recuperem (Gouveia *et al.*, 2010; Moura *et al.*, 2015).

1.1 O castanheiro

1.1.1 Origem e descrição botânica

O castanheiro é uma angiospérmica dicotiledónea, da família Fagaceae e género *Castanea*. Este género é originário da Ásia Menor, de onde derivaram as diferentes espécies para o resto do mundo. A espécie *Castanea mollissima* Blume é característica da China; a *Castanea crenata* Siebold & Zucc. do Japão; a *Castanea dentata* (Marsch.) Borkh. da América do Norte e *Castanea sativa* encontra-se distribuída pela Europa. Em Portugal, o castanheiro já existia no período pré-romano, tendo sido estes, a partir do século V a.C., os principais responsáveis pelo cultivo e difusão na Europa Ocidental (Gouveia *et al.*, 2010; Ibáñez *et al.*, 2015; Aguin-Pombo & Franquinho-Aguiar, 2018). Segundo Cronquist (1968), o castanheiro europeu apresenta a seguinte classificação taxonómica:

Quadro 1. Classificação taxonómica do castanheiro europeu.

Reino	Plantae
Sub-reino	Embryophyta (Cornophyta)
Filo	Spermatophyta (Anthophyta)
Sub-filo	Angiosperma (Magnoliophytina)
Classe	Dicotyledonae (Magnoliopsida)
Sub-classe	Hamamelidae
Ordem	Fagales
Família	Fagaceae
Sub-família	Castaneoideae
Género	<i>Castanea</i>
Espécie	<i>Castanea sativa</i>

O castanheiro é uma árvore de grande porte, com uma altura média entre os 10 e os 18 metros, quando conduzido para produção de fruto, mas podendo atingir uma altura máxima de 40 metros, quando conduzido em alto fuste para produção de madeira. A casca é castanha-acinzentada, lisa ou aberta longitudinalmente. As folhas são grandes (8-25 cm de comprimento, 5-9 cm de largura), lanceoladas, afiadas, com margens serrilhadas, nervura central marcada e as laterais paralelas, pecíolo curto e a superfície superior da folha apresenta um verde mais brilhante. Esta espécie é monóica, apresentando flores masculinas e femininas separadas. As flores masculinas são dispostas em amentilhos (5 a 15 cm de

comprimento), enquanto as flores femininas são geralmente posicionadas na base das masculinas na parte superior dos brotos do primeiro ano. Os amentilhos masculinos têm um comprimento de 10 a 15 cm e até 1 cm de diâmetro. São direitos ou ligeiramente curvos e apresentam uma coloração em tons de amarelo pálido. Na parte apical das inflorescências em forma de cacho, desenvolvem-se amentilhos andróginos. Na base destes amentilhos, crescem flores femininas, que, posteriormente, se transformam nos ouriços e nos frutos, quando fecundadas (Aguin-Pombo & Franquinho-Aguiar, 2018; Tardío *et al.*, 2018). A castanha é um aquênio composto por duas peles; a parte externa é castanho-brilhante (pericarpo), a interna é uma película aderente ao fruto e os cotilédones são de cor branca comestíveis (Conedera *et al.*, 2016). O castanheiro inicia a frutificação aos 6 anos, atinge produção plena aos 10 anos e começa a diminuir a partir dos 70 anos (Paiva, 2007).

1.1.2 Distribuição geográfica

O castanheiro encontra-se atualmente distribuído em torno do Mar Mediterrâneo, do sul da Europa (Península Ibérica, Itália, Balcãs, ilhas do Mediterrâneo) e norte da África, para o Médio Oriente, embora também esteja presente no Noroeste da Europa (Inglaterra, Bélgica), ocupando na Europa uma área de mais de 2,5 milhões de hectares (Tardío *et al.*, 2018). A maior parte da área (89%) está concentrada em apenas alguns países (França, Itália, Espanha, Portugal e Suíça) com uma longa tradição de cultivo da castanha. O castanheiro apresenta um carácter multifuncional podendo ser utilizado para a produção de madeira ou para a produção de fruto, além de uma vasta gama de produtos secundários e do papel importante que desempenha nos ecossistemas (Conedera *et al.*, 2016). A sua área de distribuição em Portugal (Figura 1) resulta da adaptação ecológica às condições de cultivo, sendo que, em termos climáticos possui viabilidade cultural e vitalidade vegetativa em climas temperados ou mediterrâneos. Em Portugal, o castanheiro distribui-se com grande densidade nas terras frias de Trás-os-Montes e nas Beiras, localizando-se também em alguns núcleos menores no Nordeste Alentejano (Serras de S. Mamede e Marvão), Norte Algarvio (Serra de Monchique) e Minho Interior (Serra do Gerês), e ainda, de um modo disperso, em vários pontos a norte do Tejo. Nestes locais o castanheiro cultiva-se perto do fundo dos vales, devido à maior disponibilidade de água (Capelo & Catry, 2007; Gomes-Laranjo *et al.*, 2007; Borges *et al.*, 2008).

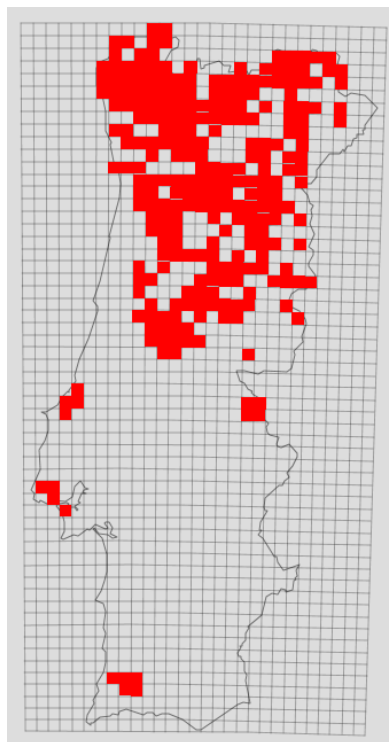


Figura 1. Distribuição da espécie *Castanea sativa* Mill. em Portugal continental (Araújo *et al.*, 2019).

1.1.3 Importância económica

O castanheiro Europeu é uma espécie com grande importância económica em Portugal, devido à sua aptidão florestal e frutícola, sendo também uma cultura muito importante no sistema agroflorestal característico das regiões montanhosas de Portugal, essencial para o ambiente, paisagem e economia local (Costa *et al.*, 2011). Durante muitos séculos, constituiu a base alimentar das populações rurais, devido à sua boa adaptação às condições edafoclimáticas, até ao aparecimento do milho e da batata. O consumo de frutos de castanha aumentou em muitos países europeus, principalmente devido ao reconhecimento das suas qualidades nutricionais e potenciais efeitos benéficos para a saúde, nomeadamente a proteção que é fornecida pelos seus compostos antioxidantes (Borges *et al.*, 2008). As cultivares portuguesas de castanha possuem qualidades reconhecidas no mercado internacional e dada a sua importância, torna-se cada vez mais necessário implementar programas que monitorizem a sua biodiversidade tendo em vista a preservação do património genético nacional (Aguin-Pombo & Franquinho-Aguiar, 2018). Por isso, foram criadas as regiões com Denominação de Origem Protegida (DOP) para o reconhecimento do

valor das variedades regionais de castanha. Em Portugal, existem quatro variedades DOP: Castanha da Terra Fria, Castanha da Padrela, Castanha dos Soutos da Lapa e Castanha Marvão-Portalegre (DGADR, 2019).

Segundo dados da FAO, a produção mundial de castanha entre 2006 a 2016 aumentou de 1,5 milhões toneladas para 2,3 milhões toneladas, e a área de produção passou de 450 milhões de hectares em 2006 para 600 milhões de hectares em 2016. A Europa é responsável por produzir 6,7% da produção mundial, a maior parte na Turquia (2,7%), Itália (2,3%), Grécia (1,4%), Portugal (1,2%), Espanha (0,7%) e França (0,4%) (FAO, 2016).

A área cultivada em Portugal, no ano de 2018, era de 38 874 hectares, tendo alcançado uma produção de 34 131 toneladas e uma produtividade média de 0,88 t ha⁻¹, fazendo de Portugal o sétimo maior produtor de castanha do mundo, sendo na região norte onde se verifica a maior percentagem de área cultivada (54%) e de produção (50%) (INE, 2018).

No quadro 2 é possível visualizar a superfície destinada à produção de castanha, bem como a quantidade de castanha produzida no território nacional, segundo os dados publicados em 2018 pelo Instituto Nacional de Estatística (INE).

Quadro 2. Superfície de produção de castanha e respetiva produção em Portugal (INE, 2018).

	Superfície (ha)	Produção (t)
Continente	38 728	33 929
Norte	34 504	29 908
Centro	3 683	2 756
Área metropolitana de Lisboa	5	6
Alentejo	520	1 245
Algarve	16	15
Açores	52	112
Madeira	94	90
Total	71 602	68 061

1.2 O cancro do castanheiro

1.2.1 Origem e dispersão da doença

O cancro-do-castanheiro causado por *C. parasitica* foi descrito pela primeira vez nos Estados Unidos em 1904, em *Castanea dentata* tendo-se disseminando rapidamente por todo o

habitat natural do castanheiro americano e destruindo, em cinquenta anos, 3,5 bilhões de castanheiros (Anagnostakis *et al.* 1988). *C. parasitica* é um fungo da micoflora natural dos castanheiros asiáticos (*C. crenata*, *C. mollissima*) (Gouveia *et al.*, 2005), sendo estes por isso mais resistentes à doença devido à coexistência e evolução em conjunto o que permitiu às espécies asiáticas adquirir uma tolerância natural a este agente patogénico. As árvores das espécies asiáticas produzem tecido peridermático que pode deter o crescimento do micélio e prevenir que o cancro aumente e rodeie o tronco/ ramo infetado causando assim a morte do mesmo (Kolp *et al.*, 2018). Passados 35 anos, foi assinalada a presença desta doença em Itália, perto de Génova, no norte de Itália, em castanheiros europeus (Milgroom & Cortesi, 2004) de onde se dispersou para toda a Europa (Aguin-Pombo & Franquinho-Aguiar, 2018). A partir da Itália, a doença espalhou-se rapidamente para as regiões vizinhas da França, Suíça e Eslovênia, e também para as regiões de produção de castanha no leste e sul da Europa Oriental e Turquia (Rigling & Prospero, 2018).

Na figura 2 encontra-se representada a distribuição atual da doença pelas regiões produtoras de castanha.

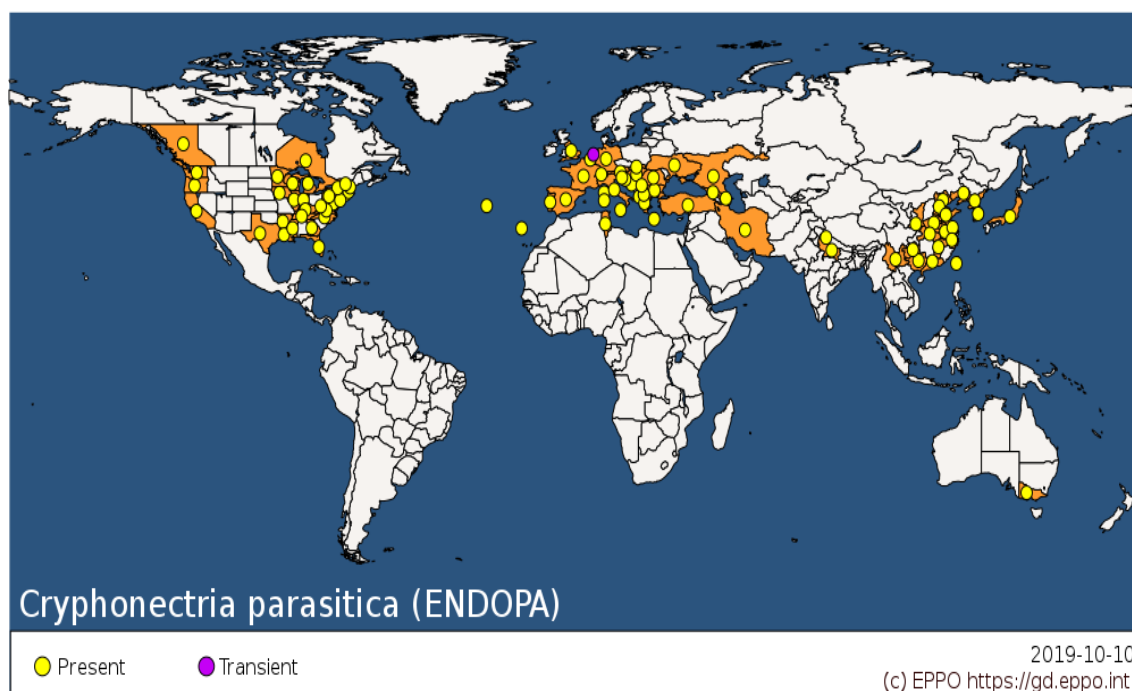


Figura 2. Mapa da distribuição mundial de *Cryphonectria parasitica* em Outubro de 2019 (EPPO, 2019).

Em Portugal, *C. parasitica* foi descrita pela primeira vez por Câmara (1929), em amostras de casca colhidas de ramos de *Castanea crenata* Sieb. & Zucc, na província da Beira Interior.

Estas infecções iniciais foram provavelmente erradicadas com sucesso, pois não houve mais nenhum relato da doença até 1989, quando dois focos da doença foram encontrados em Trás-os-Montes, no nordeste de Portugal (Bragança *et al.*, 2007). Apesar disso, a ocorrência natural de hipovirulência e a maior tolerância do castanheiro europeu ao fungo impediram os níveis de mortalidade verificados anteriormente nos Estados Unidos da América (Heiniger & Rigling, 1994). *C. parasitica* está classificado como organismo de quarentena da lista A2 da OEPP (Organização Europeia e Mediterrânea da Proteção das Plantas) e que se encontra regulamentada pela Diretiva 77/93/CEE. As medidas de quarentena não foram, no entanto, suficientes para impedir a introdução e dispersão do cancro do castanheiro em Portugal (Gouveia *et al.*, 2005; OEPP/EPPO, 2018).

1.2.2 Sintomatologia da doença

C. parasitica provoca cancrios corticais nos troncos e ramos levando à morte das árvores num curto período de tempo (Gouveia *et al.*, 2016). O fungo infecta apenas os órgãos aéreos da planta, penetrando preferencialmente por feridas (podas, cortes, cicatrizes), evoluindo sob a casca da árvore e provocando a destruição da zona cambial. Os primeiros sintomas manifestam-se, no Verão, com o aparecimento de lesões ou cancrios, no tronco e nos ramos. Quando a lesão atinge todo o perímetro do tronco ou ramo, verifica-se o estrangulamento dos mesmos, impedindo a circulação da seiva e a parte do ramo acima da lesão, murcha e seca. Nos ramos jovens, o sintoma mais evidente é a existência de pontuações avermelhadas que contrastam com a cor verde-azeitona da casca normal. Com o desenvolvimento subcortical do fungo, ocorre o fendilhamento longitudinal da casca (Figura 3). Pode ocorrer rebentação adventícia abaixo da zona afetada, permanecendo vivo o sistema radicular e a zona abaixo do cancro (Rigling & Prospero, 2018). O fungo cresce no câmbio e no tecido da casca forma leques miceliais de cor amarelo-acastanhada. A reação da planta resulta em cancrios na casca. A doença é facilmente visível a partir das folhas secas que permanecem nos ramos (Gouveia *et al.*, 2010).

O processo de infecção de *C. parasitica* começa através da entrada dos esporos (conídios ou ascósporos) na casca do castanheiro através de aberturas naturais ou feridas (Hebard *et al.* 1984; Aguin *et al.*, 2011). Posteriormente, *C. parasitica* pode produzir esporos (picnídios e peritecas) sobre a casca infetada, bem como sobre a casca de madeira de castanheiro recentemente morta. No campo, as características que tornam possível diferenciar estirpes

virulentas de hipovirulentas, é o facto de que as hipovirulentas apresentarem baixa esporulação (Prospero *et al.*, 2006; Pereira *et al.*, 2015). A formação de periderme da ferida é continuamente inibida em espécies de castanha suscetíveis, porque o avanço dos leques miceliais matam as células do hospedeiro através de toxinas e enzimas que degradam a parede celular (Bragança *et al.*, 2007).



Figura 3. Sintomas do cancro do castanheiro em *Castanea sativa* (ramos mortos; fendilhamento da casca; coloração avermelhada do cancro).

1.2.3 *Cryphonectria parasitica*

C. parasitica (Murill) Barr, é um fungo ascomiceta pertencente à Classe Pyrenomycetes, à Ordem Diaporthales e à Família Valsaceae. Nativo do continente asiático, é responsável pelo cancro do castanheiro (Anagnostakis, 1987). Este fungo foi descrito pela primeira vez em 1906 como *Diaporthe parasitica* Murr. e renomeado em 1912 como *Endothia parasitica* (Murril) P. Anderson & Anderson (Griffin & Elkins, 1986).

Os principais hospedeiros são espécies do género *Castanea* (Família Fagaceae), particularmente o castanheiro americano (*Castanea dentata*), o castanheiro europeu (*Castanea sativa*), o castanheiro chinês (*Castanea mollissima*) e o castanheiro japonês (*Castanea crenata*). *C. parasitica* tem dois tipos de estirpes: virulentas, que causam lesões severas à árvore, e hipovirulentas, que não causam danos devido ao fato de serem portadoras de um hypovirus que atenua a virulência do fungo. *C. parasitica* produz dois tipos de esporos: assexuados (conídios) e sexuais (ascósporos). Na fase assexuada, o fungo forma picnídios globosos, de cor de amarelo-alaranjado, variáveis em tamanho (100-300 µm de diâmetro) e com um ostíolo que liberta os esporos assexuados (conídios). Os picnídios podem aparecer isolados ou agregados, podendo formar grupos com mais de 1 mm de diâmetro. A emissão de conídios ocorre mais abundantemente na primavera e no outono (Marra & Milgroom, 2001; EPPO, 2005; Rigling *et al.*, 2018). Na fase sexuada, o fungo forma peritecas, dentro das quais se encontram os ascos, de forma elíptica, que possuem grupos de oito ascósporos em disposição bisseriada (Aguín *et al.*, 2011). O ciclo de vida de *C. parasitica* é apresentado na figura 4.

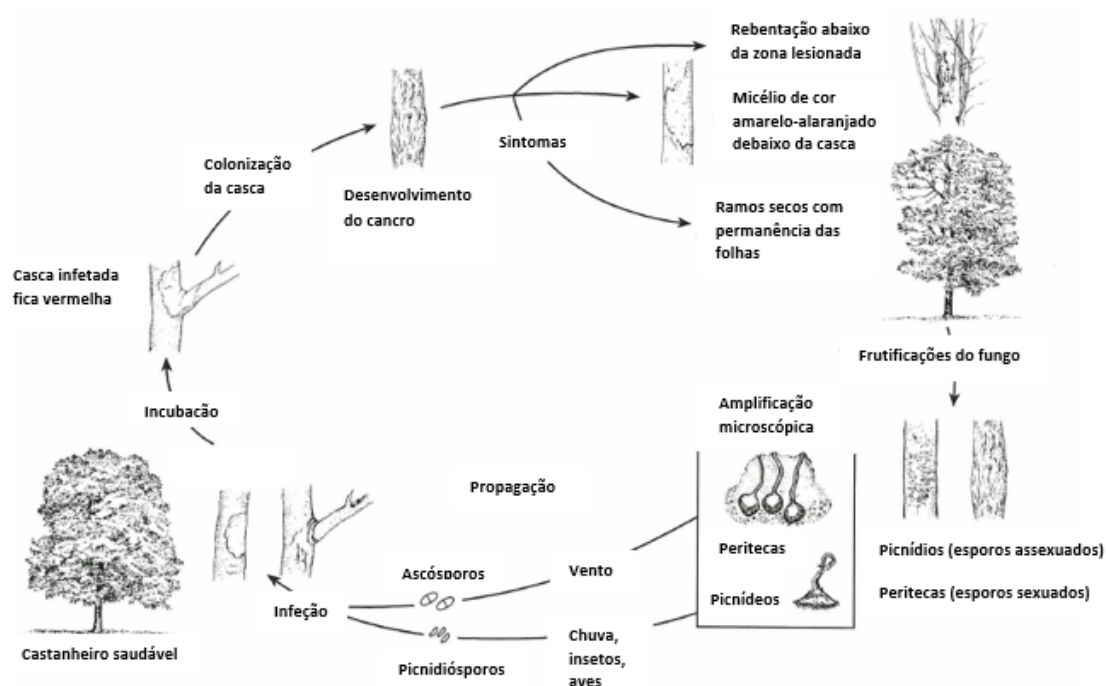


Figura 4. Ciclo de vida de *Cryphonectria parasitica* (Adaptado de Heiniger, 1997).

O tipo de reprodução é determinado por fatores ambientais como nutrição disponível, temperatura e luz, sendo que, a reprodução sexuada pode ser induzida por falta de azoto, luz e baixas temperaturas (Smith, 2013). O principal agente de propagação da *C. parasitica* é o

vento, que pode transportar os ascósporos a grande distância, mas também pode ser feito através de animais, como pássaros e insetos. Os conídios, no entanto, apesar de também darem origem à doença, não apresentam dispersão pelo ar, pois estão envoltos em uma substância viscosa que impede, e são transportados pela chuva ou nas patas, penas e pêlos de pequenos animais e insetos. O homem também é um vetor importante na disseminação da doença devido à comercialização de castanheiros infetados. As práticas culturais também podem contribuir para a disseminação, quando material usado para poda ou enxertia está infetado (Anagnostakis, 1998; Heiniger & Rigling, 1994). O fungo pode surgir em qualquer altura do ano, sempre que as condições sejam favoráveis ao seu desenvolvimento, nomeadamente, elevados teores de humidade e temperatura amena. As fontes de inóculo podem encontrar-se tanto sobre material morto, restos de ramos ou árvores mortas (Aguín-Pombo & Franquinho-Aguiar, 2018). O homem contribuiu significativamente para a propagação do cancro, especialmente através do transporte de material infetado para áreas livres da doença e através do uso de ferramentas contaminadas, como por exemplo durante a poda (Aguín, 2011).

1.3 Hipovirulência

A atenuação da virulência de um patógeno fúngico por um vírus é conhecida como hipovirulência (Zamora *et al.*, 2015). A hipovirulência transmissível provoca uma infeção que afeta a população do fungo responsável pelo cancro do castanheiro. Considerada responsável pelo declínio da doença, foi observada em várias regiões da Europa depois de 1951 e ocorre devido à infeção de *C. parasitica* por *Cryphonetria hypovirus* que atenua a virulência do fungo (Anagnostakis *et al.*, 1998; Allemann *et al.*, 1999).

Os hipovírus de RNA de cadeia dupla encontram-se no citoplasma do fungo e reduz a virulência do patógeno inibindo a reprodução sexual e reduzindo o crescimento do micélio e a produção de conídios (Kolp *et al.*, 2018). A disseminação dos hipovírus está diretamente relacionada com os grupos de compatibilidade vegetativa (VCtypes), pelo que este meio de luta exige que se conheça previamente a estrutura populacional de *C. parasitica* e que se identifiquem os (VCtypes) presentes em cada soto. A transmissão do hipovírus é feita horizontalmente por anastomose das hifas em estirpes compatíveis, fazendo com que a

estirpe virulenta perca as suas características patogénicas e permitindo a ação das defesas naturais da árvore. Quando uma estirpe virulenta adquire caráter hipovirulento considera-se que sofreu uma conversão, verificando-se algumas alterações das características morfológicas, nomeadamente em vez de coloração laranja, a colónia apresenta coloração branca e reduzida ou ausente formação de conídios (Figura 5) (Gouveia *et al.*, 2010). As estirpes hipovirulentas são difíceis de detetar no campo, pois causam apenas cancos superficiais, que não provocam danos à árvore (Heiniger & Rigling, 1994). A regressão do cancro do castanheiro verifica-se pela formação de tecido cicatricial que se opõe à progressão do fungo, deixando a parte afetada isolada que depois seca e cai, dando origem a novos tecidos (Anagnostakis *et al.*, 1986; Macdonald & Fulbright, 1991). O sucesso da hipovirulência depende da diversidade dos grupos de compatibilidade vegetativa presentes no souto e do tipo de reprodução do fungo (Gouveia *et al.*, 2010).

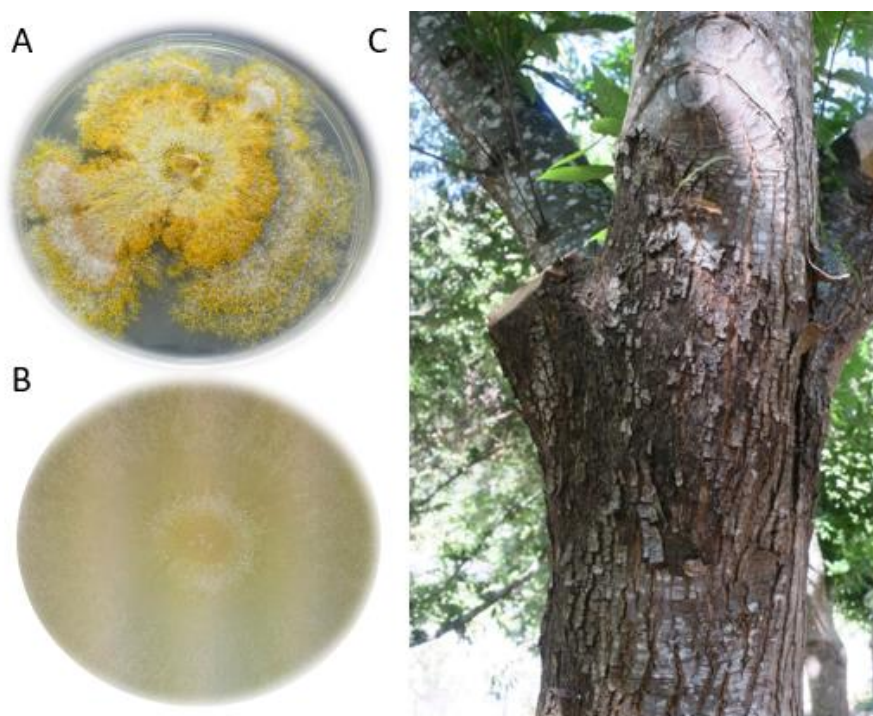


Figura 5. Diferenças morfológicas entre estirpes virulentas e hipovirulentas de *Cryphonectria parasitica*. A: Cultura de *C. parasitica*; B: Cultura de *C. parasitica* com hipovírus; C: Cancro curado.

1.3.1 Tipos de hypovírus de *C. parasitica*

Os estudos realizados nos últimos 15 anos mostraram a existência de uma grande diversidade de espécies virais presentes em isolados de *C. parasitica*. Os vírus descritos pertencem a quatro famílias: Reoviridae, Narnaviridae, Partitiviridae e Hypoviridae (Hillman e Suzuki, 2004). Os vírus mais significativos para o controlo biológico do cancro do castanheiro são os da família Hypoviridae. Dentro desta família existem quatro espécies, *Cryponectria hypovirus* 1 (CHV1), *Cryponectria hypovirus* CHV2, *Cryponectria hypovirus* CHV3 e *Cryponectria hypovirus* CHV4, que apresentam diferenças na estrutura do genoma, na relação entre sequências e nos sintomas causados no fungo hospedeiro (Hillman *et al.*, 2000; Hillman & Suzuki, 2004; Aguín *et al.*, 2011).

O CHV1 encontra-se principalmente na Europa e é o mais importante para o controle biológico do cancro do castanheiro. Os isolados de *C. parasitica* infetados por este hipovírus apresentam diversas alterações fenotípicas no fungo, como redução da esporulação assexuada, inibição da reprodução sexual, alteração da morfologia da colónia e redução da pigmentação (Allemann *et al.*, 1999; Nuss 2005). O CHV2 e o CHV3 também causam hipovirulência em *C. parasitica*, mas foram encontrados quase exclusivamente na América do Norte. O CHV4 (até recentemente conhecido como dsRNA do tipo SR2) é encontrado amplamente na região dos Apalaches no leste da América do Norte. Apesar de ser considerado um hipovírus devido à sua estrutura genómica, o CHV4 tem pouco ou nenhum efeito sobre a virulência ou outros fenótipos em *C. parasitica* (Bragança *et al.*, 2007). Supõe-se que o CHV1 foi introduzido na Europa a partir da Ásia juntamente com o seu hospedeiro e posteriormente espalhou-se pela Europa pelo fungo hospedeiro num intervalo de tempo de cerca de 20 a 30 anos (Heiniger & Rigling 1994; Peters *et al.*, 2014).

1.3.2 Disseminação do hypovírus

Os hipovírus espalharam-se por toda a Europa, levando à recuperação de muitas populações de castanheiro europeu, uma vez que as árvores podem produzir periderme suficiente para conter os cancros produzidos por estirpes hipovirulentas de *C. parasitica* (Milgroom & Cortesi, 2004). O principal modo de transmissão do dsRNA viral é através da anastomose das hifas por troca citoplasmática entre as estirpes do fungo hipovirulento e virulento, mas

também pode ocorrer por esporos assexuados (conídios). Os ascósporos sexuais não contêm o vírus (Van Alfen *et al.*, 1975; Ibáñez *et al.*, 2015).

Os hipovírus não possuem uma fase extracelular e só podem ser transmitidos de uma estirpe fúngica para outra por troca citoplasmática após anastomose das hifas. A disseminação do CHV1 dentro da população de fungos depende da dispersão de esporos assexuados contendo vírus que também podem subsequentemente transmitir o hipovírus a outros indivíduos após a fusão de hifas (Peters *et al.*, 2014).

Os hipovírus são transmitidos livremente entre indivíduos do mesmo VCtype, mas a transmissão entre indivíduos incompatíveis depende dos genótipos dos indivíduos que interagem com o hospedeiro. A transmissão dos hipovírus é controlada por um sistema de compatibilidade vegetativa (*vic* genes) envolvendo pelo menos seis *vic loci* bialélicos não ligados, de modo que o hipovírus pode ser transmitido apenas entre isolados do mesmo tipo, tendo a mesma combinação dos alelos em todos os *vic loci*, ou então, entre grupos de compatibilidade vegetativa estreitamente relacionados. Outro fator que condiciona a disseminação do hipovírus é a compatibilidade sexual, que é controlada por dois alelos de tipo de reprodução (MAT-1 e MAT-2) num único *loci*. A presença de ambos os tipos de reprodução em *C. parasitica* favorece o aumento da diversidade de VCtypes por reprodução sexuada, especificamente através da recombinação de genes *vic* (polimórficos). Em *C. parasitica* estão caracterizados seis loci o que determina um total de 64 grupos de compatibilidade vegetativa (Cortesi & Milgroom 1998; Marra & Milgroom, 2001; Zamora *et al.*, 2014; Gouveia *et al.*, 2016).

1.3.3 Mecanismo de infecção do vírus

Os hipovírus de *C. parasitica* não têm uma fase extracelular e são transmitidos verticalmente para os descendentes através de anastomose das hifas e a mistura do citoplasma de um indivíduo com outro (Milgroom & Cortesi, 2004).

Após a fusão das hifas o hipovírus é facilmente transmitido entre estirpes do mesmo grupo de compatibilidade vegetativa, ou seja, estirpes que partilham os mesmos alelos em todos os *vic loci*. A transmissão do vírus também pode ocorrer entre estirpes de diferentes VCtypes, mas geralmente a taxas mais baixas e dependendo da natureza e do número de *vic loci* heteroparalelos. A diversidade de VCtypes é, assim, considerado como um fator crítico para a

disseminação do hipovírus dentro das populações de *C. parasitica* (Cortesi *et al.*, 2001; Peters *et al.*, 2014). A infecção de *C. parasitica* pelo hipovírus não só torna o isolado menos virulento, como causa inúmeras mudanças fenotípicas no fungo, incluindo a redução da pigmentação, redução da esporulação assexuada e perda da fertilidade (Nuss, 2005).

1.3.4 Incompatibilidade vegetativa

O estudo da variação da estrutura populacional de *C. parasitica* é muito importante pois a diversidade de tipos de compatibilidade vegetativa está associada ao sucesso do controlo biológico por hipovirulência (Anagnostakis *et al.*, 1986; Sotirovski *et al.*, 2004). Este controlo depende da transmissão bem-sucedida do hipovírus entre indivíduos, por isso, a incompatibilidade vegetativa vai inibir a transmissão horizontal do vírus. Os vírus fúngicos são transmitidos horizontalmente entre indivíduos apenas por contato célula-a-célula, no qual as hifas se fundem (anastomoses) e o citoplasma de um indivíduo contendo vírus mistura-se com o do outro (Figura 6) (Papazova-Anakieva *et al.*, 2007).

A incompatibilidade vegetativa é comum em fungos funcionando como um mecanismo de defesa contra doenças transmitidas citoplasmicamente, impedindo a formação de anastomoses estáveis e trocas citoplasmáticas entre indivíduos (Rigling & Prospero, 2018). A formação e a estabilidade da anastomose das hifas entre estirpes de *C. parasitica* é determinadas por vários genes *vic* que controlam a incompatibilidade vegetativa (Cortesi & Milgroom, 1998; Peters *et al.*, 2014). Este sistema de incompatibilidade vegetativa é um processo de regulação genética que geralmente causa a morte das células das hifas quando estas se fundem, embora existam alguns casos em que se verificou alguma transmissão entre indivíduos incompatíveis. Além disso, a diversidade de VCtypes pode aumentar devido à recombinação de alelos *vic loci* polimórficos durante a reprodução sexual. A compatibilidade sexual em *C. parasitica* é controlada por um único *loci* (MAT) que tem dois idiomorfos Mat-1 e Mat-2 (Cortesi *et al.*, 2001; Marra & Milgroom, 2001; Ibáñez *et al.*, 2015).

A recombinação sexual de diferentes genótipos é a principal fonte de diversidade de grupos de compatibilidade em *C. parasitica*, mas também pode ocorrer por mutações genéticas ou por introdução de novos grupos de compatibilidade (Heiniger & Rigling, 1994).

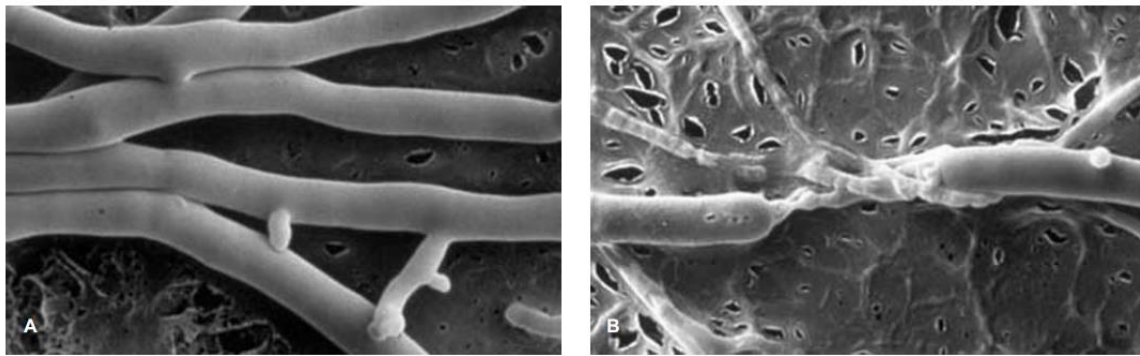


Figura 6. Transmissão horizontal do hipovírus por anastomose das hifas em estirpes de *Cryphonectria parasitica* (Heininger, 1997). A: Estirpes compatíveis - verifica-se a formação de uma ligação estável entre as hifas para a transferência do hypovírus. B: Estirpes incompatíveis- não há transferência do hypovírus devido ao estrangulamento das hifas.

Em Portugal, ainda não foi detetada a presença de muitos VCtypes, o que favorece o tratamento da doença com a hipovirulência. Em 2007 (Figura 7) estavam descritos pelo menos, nove VCtypes no nosso país (Bragança, 2007), sete deles conhecidos noutros países da Europa, integrantes de uma coleção de 72 GCV europeus, e dois (P-7 e P-9) que não existiam até há pouco tempo na Europa, podendo ter origem noutro continente ou serem mesmo grupos novos. O grupo mais abundante em Portugal é o VCtype EU11 (Bragança, 2007; Moura *et al.*, 2015; Gouveia *et al.*, 2016;).

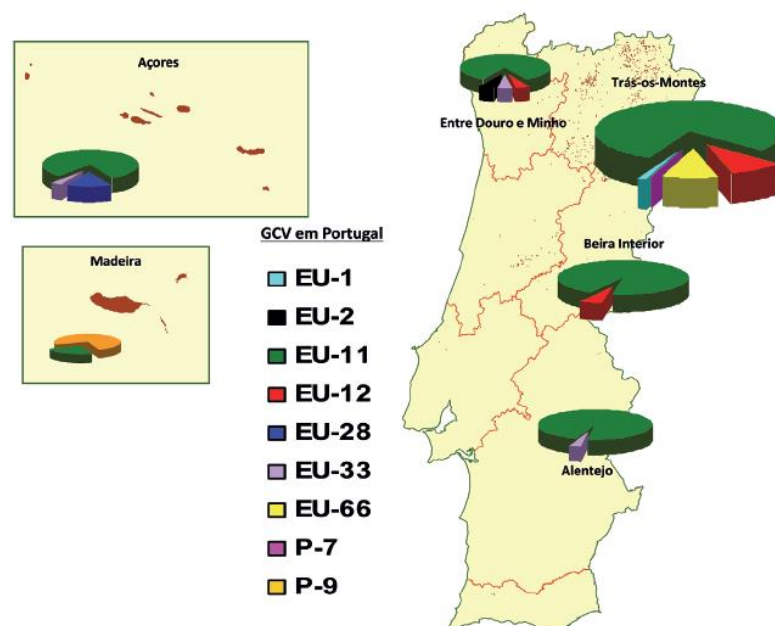


Figura 7. Distribuição dos Grupos de Compatibilidade Vegetativa (GCV) do fungo *Cryphonectria parasitica* em Portugal (Bragança, 2007).

1.4 Meios de luta do cancro do castanheiro

O cancro do castanheiro tem causado alta mortalidade de castanheiros desde a sua introdução e as tentativas de erradicação da doença através de abordagens sanitárias falharam, tendo inclusive, por vezes, piorado a dispersão da doença devido às frequentes ações de corte (Gouveia *et al.*, 2010). Para evitar a introdução e propagação de *C. parasitica*, foram adotados regulamentos de quarentena em todo o mundo, regulando o transporte e a comercialização de castanheiros de madeira e casca, sementes e plantas vivas. As plantas de castanheiro para instalação de pomares só podem ser transportadas na Europa se forem acompanhadas de um passaporte fitossanitário que ateste que são originários de áreas livres de *C. parasitica* ou que nenhuma observação de *C. parasitica* tenha sido feita no local de produção ou arredores desde o início do último ciclo completo de vegetação. Estas medidas não impediram, no entanto, a propagação do patógeno devido ao problema causado por plantas infetadas assintomáticas, que não podem ser detetadas através de inspeções visuais (Rigling & Prospero, 2018). Após a introdução de *C. parasitica* numa nova área, os esforços de erradicação dos tecidos doentes, através do corte e a queima das partes infetadas, são frequentemente realizados, no entanto, não são capazes de controlar a doença devido à dificuldade em eliminar todas as fontes de inóculo. Pode-se tentar prevenir infeções evitando feridas na casca. Quando isso não for possível, devido à poda ou enxertia, devem-se evitar os ferimentos durante os períodos de produção de esporos e proteger as feridas para evitar contaminação. É também fundamental desinfetar as ferramentas utilizadas e optar por técnicas menos invasivas (Prospero & Rigling, 2013). Os meios de luta químicos não são eficazes no combate do cancro do castanheiro e apenas a luta biológica por hipovirulência tem mostrado ser eficaz na Europa. A aplicação de uma estirpe hipovirulenta nos cancros leva à recuperação da árvore por conversão da estirpe virulenta numa estirpe hipovirulenta (Moura *et al.*, 2015).

1.4.1 Hipovirulência natural

Dez a 25 anos após o estabelecimento de uma nova população de *C. parasitica*, verifica-se o aparecimento da hipovirulência natural que tem sido responsável pela redução da severidade da doença na Europa (Heiniger & Rigling, 1994). O potencial de biocontrole da hipovirulência foi descoberto por Grente (1965) o que levou à realização estudos sobre a biologia e aplicação de hipovirulência (Rigling & Prospero, 2018). Passadas duas décadas, após a introdução do cancro do castanheiro em Portugal, a hipovirulência começou a observar-se em alguns locais (Martins *et al.*, 2015). O fenómeno da hipovirulência foi observado pela primeira vez na Itália, na década de 1950, em soutos altamente afetados pela doença, que mostravam sinais de recuperação da doença (Heiniger & Rigling, 1994). A dispersão natural da hipovirulência, por anastomose de hifas e transmissão de dsDNA pelo citoplasma de estirpes hipovirulentas, conduz à formação de tecido cicatricial, impeditivo de evolução das lesões e é a causa mais apontada para a melhoria do estado sanitário atual do castanheiro (Abreu, 1992).

1.4.2 Hipovirulência como meio de luta contra o cancro do castanheiro

A hipovirulência é um método de luta biológico de grande eficácia quando se conhece a estrutura da população do fungo parasita e se aplicam as estirpes hipovirulentas compatíveis (Gouveia *et al.*, 2016), tendo reduzido o impacto da doença na Europa.

A aplicação deste meio de luta necessita da produção em laboratório de estirpes hipovirulentas compatíveis com a estirpe virulenta presente no souto e a sua aplicação na margem dos cancros ativos. O controlo biológico por hipovirulência é considerado um método eficiente para o controlo da doença promovendo a recuperação das árvores infetadas (Pereira *et al.*, 2015). O Instituto Politécnico de Bragança desenvolveu um produto biológico especificamente para o tratamento do Cancro do Castanheiro em Portugal – DICTIS. A substância ativa deste produto são estirpes hipovirulentas de *C. parasitica*. O bioproduto é produzido no Laboratório de Sanidade Vegetal – IPB ao abrigo de um “Programa de luta biológica para o cancro do castanheiro”, através de protocolo entre o IPB e a DGAV. O

produto tem autorização especial da DGAV para aplicação na zona Norte (Minho, Trás-os-Montes e Beira Alta) e Alentejo (DGAV- Ref 009276 de 10.04.2015).

1.4.3 Fatores epidemiológicos que afetam a virulência

O sucesso do controlo biológico com a hipovirulência está dependente da dispersão dos hipovírus pela população hospedeira do fungo mais rapidamente do que a reprodução do fungo. A reprodução sexual tem dois efeitos epidemiológicos agravantes, que residem no facto de os ascósporos não serem portadores do vírus no seu genoma e se dispersarem a maiores distâncias que os conídios, dificultando assim a invasão do hipovírus nas populações de *C. parasitica* (Gobbi & Intropido, 1984; Heiniger & Rigling, 1994). A difícil erradicação do patogénio resulta das suas estratégias evolutivas, como a produção de uma grande quantidade de conídios, pode sobreviver como saprófita em vários hospedeiros, tem reprodução sexuada e assexuada, consegue invadir e matar rapidamente o hospedeiro e pode sobreviver a longos períodos em condições climáticas adversas (Manion, 1981). Um fator ambiental que parece influenciar bastante o desenvolvimento do cancro e, consequentemente, a disseminação da *C. parasitica* é a temperatura do ar. A humidade do ar, chuva ou orvalho também é importante para a sobrevivência, desenvolvimento e disseminação de *C. parasitica*. A idade de uma ferida na casca parece também influenciar a probabilidade de *C. parasitica* causar infeção (Griffin, 1986; Rigling *et al.*, 2018).

1.5 Objetivos

A hipovirulência é um método de luta biológico que tem apresentado resultados positivos no controlo do cancro do castanheiro na Europa. Com este trabalho pretende-se isolar e estudar as características biológicas da população de *C. parasitica* e de possíveis estirpes hipovirulentas, presente em soutos da região do Entre Douro e Minho, localizados em Ponte de Lima, Ponte da Barca e Arcos de Valdevez.

O estudo da diversidade e da prevalência das populações de *C. parasitica* no Minho, e a deteção e identificação do vírus CHV1 será determinante para avaliar a possibilidade de

aplicação de estirpes hipovirulentas como meio de luta preferencial contra a doença no Minho.

O trabalho enquadra-se no âmbito do projeto PDR2020-101-030943 - “BioChestnut-IPM - Implementar estratégias de luta eficazes contra doenças do castanheiro amendoeira”

2. Materiais e métodos

2.1 Localização dos soutos estudados e avaliação da severidade da doença

Com o objetivo de avaliar a incidência e severidade do cancro do castanheiro e estudar a diversidade populacional de *C. parasitica*, foram selecionados quatro soutos da Região do Entre Douro e Minho localizados em Ponte da Barca, Arcos de Valdevez e Ponte de Lima. O souto de Crasto localiza-se no concelho de Ponte da Barca e pertence à Quinta do Outeiro. Apresenta uma área de 4 ha com uma plantação de 6 anos de variedades híbridas (90% Marigoule e 10% Marsol). O souto de Oleiros localiza-se no concelho de Ponte da Barca e tem castanheiros com idades entre 10 e 30 anos. Apresenta uma área de 2,6 ha com as variedades híbridas Bouche de Betizac e Marigoule. O terceiro souto localiza-se em Cendufe, no concelho de Arcos de Valdevez. Apresenta uma área de 3 ha, com castanheiros da variedade Colon3 e Marigoule, plantados em 2001. O souto de Cepões localiza-se no concelho de Ponte de Lima. Foi plantado em 2006 e pertence à Quinta do Eido da Devesa. Apresenta uma área de 8 ha com castanheiros de variedades Boche de Betizac e Marigolde.

Estes soutos apresentavam cancros agressivos e alguns cancros curados por hipovirulência natural. Para avaliar o grau de severidade da doença, as árvores selecionadas foram classificadas com base na aplicação da escala de severidade de 1 a 5 proposta por Juhásová e Bernadovičová (2001) apresentada no Quadro 3:

Quadro 3. Escala de classificação do grau de severidade do cancro do castanheiro.

Índice de severidade	Sintomas
1	Árvore sã
2	Presença de um cancro com área reduzida
3	Presença de dois cancros ou um com extensão razoável
4	Presença de três ou mais cancros e/ou áreas afetadas muito extensas
5	Árvore sem viabilidade biológica

2.2 Recolha de material vegetal infetado

Os soutos selecionados para este estudo apresentavam várias árvores afetadas com a doença e também algumas com cancos curados por hipovirulência natural. Em primeiro lugar, foi feita uma observação geral do souto para avaliar o estado sanitário e para detetar os sintomas do cancro.

Em cada souto foram analisadas 30 árvores. As árvores foram numeradas com spray e foram recolhidas as coordenadas geográficas das árvores para georreferenciação. Em cada árvore foram recolhidas informações das características morfológicas do cancro, se este se encontrava ativo ou curado e se apresentava estruturas reprodutoras do fungo (picnídios).

Para a obtenção de isolados de *C. parasitica* recolheram-se amostras de material vegetal de árvores com cancos ativos e também de cancos curados, nos quatro soutos estudados. Foram amostradas um total de 129 árvores, 34 no souto de Crasto, 32 no souto de Oleiros, 30 no souto de Arcos de Valdevez e 33 no souto de Cepões. Foi efetuada uma amostragem em árvores que apresentavam sintomas de cancro como a copa afetada com ramos secos, casca com necroses e fissuras longitudinais, rebentação adventícia exuberante, e a presença de picnídios ou micélio sob os tecidos do castanheiro (Figura 8).



Figura 8. Árvores com cancos amostrados. A: cancro ativo; B: cancro curado.

A recolha das amostras foi feita com o auxílio de um *punch* (Figura 9). Foram retiradas 6 porções de madeira em cada árvore e colocados em tubos eppendorf esterilizados de 1,5ml,

devidamente identificados. Quando as árvores apresentavam cancrios curados foram também recolhidas amostras que se colocaram à parte, num tubo eppendorf diferente, para isolar em laboratório estirpes hipovirulentas. Após cada recolha de amostras de castanheiro numa árvore, o *punch* era esterilizado em álcool a 96% v/v para não haver dispersão do fungo entre as árvores. Quando não era possível recolher material com o *punch*, por a casca ser muito dura ou estar muito seca, foram recolhidos pedaços da casca com o auxílio de uma navalha ou ramos jovens que apresentavam sintomas da doença. Estes foram colocados em sacos plásticos, identificados e levados para o laboratório. As amostras foram todas guardadas no frigorífico até à sua posterior utilização.



Figura 9. Recolha de material vegetal contaminado com auxílio de um *punch*.

2.3 Isolamento e caracterização de estirpes de *C. parasitica*

Para o isolamento do fungo utilizou-se o meio de cultura Potato Dextrose Agar (PDA, Difco, 39 g L⁻¹), distribuído em placas de Petri. Os isolamentos foram realizados em condições de assepsia, à chama. Foram cortados pequenos pedaços de madeira, a partir das amostras recolhidas nos soutos e desinfetadas por imersão em álcool a 96%. Em seguida as amostras foram enxaguadas em água estéril, pousadas em papel absorvente para retirar o excesso de água e colocadas em placas de Petri à superfície do meio de cultura. As placas de Petri foram incubadas a 25°C na ausência de luz durante uma semana. Após o crescimento do micélio, foram cortadas pequenas porções de agar com o fungo e transferidos para novas placas Petri com PDA, de forma a obter culturas puras. Após incubadas a 25°C na ausência de luz durante 7 dias, as placas foram expostas à luz do laboratório durante 7 dias para desenvolvimento de esporos (Figura 10).

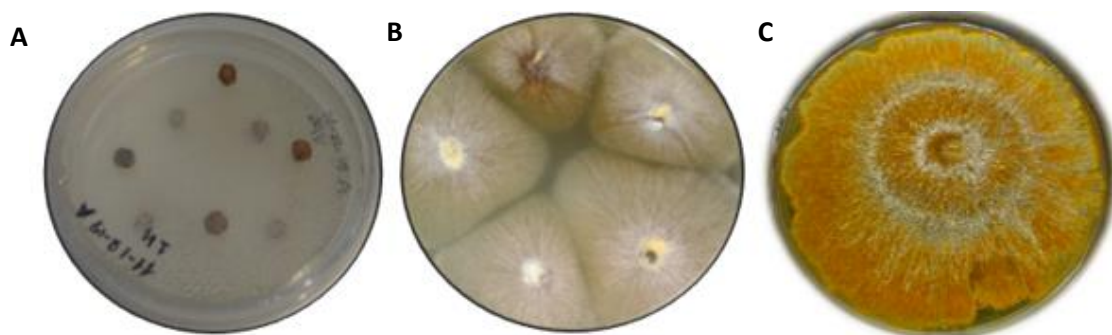


Figura 10. Isolamento e crescimento de *Cryphonectria parasitica* em placas de petri com meio PDA a partir das amostras de material vegetal contaminado, recolhido nos sotos em estudo. A- Isolamento da madeira infetada em meio PDA. B- Desenvolvimento do micélio do fungo após incubação na estufa. C- Isolado virulento puro.

Os isolados puros de *C. parasitica* foram conservados em tubos de ensaio com meio PDA inclinado, à temperatura de 4°C, tendo sido atribuído uma designação a cada isolado.

A caracterização morfológica dos isolados foi feita através da avaliação do padrão do micélio aéreo, cor da colónia, e da presença e cor dos esporos. A virulência dos isolados foi determinada através da observação da cor, considerando-se virulentos os que apresentavam micélio de cor laranja e a presença de esporos e, como possíveis hipovirulentos os isolados que apresentavam micélio de cor branca e ausência de esporos.

O padrão de crescimento micelial radial do fungo, foi determinado ao longo de sete dias, utilizando 4 isolados portugueses hipovirulentos da coleção de *C. parasitica* da Professora Eugénia Gouveia (Laboratório de Sanidade Vegetal da Escola Superior Agrária de Bragança/IPB) e cinco isolados portugueses virulentos isolados no âmbito deste trabalho (Quadro 4).

Os isolados foram inoculados em meio de cultura PDA e incubados de acordo com metodologia descrita anteriormente. A avaliação de crescimento micelial radial foi determinada pela média de dois diâmetros perpendiculares obtido em três placas (três repetições) para cada isolado ao longo de sete dias de incubação.

Quadro 4. Isolados de *Cryphonectria parasitica* utilizados na caracterização do crescimento micelial.

Isolado	VC Type	Local de isolamento	Ano de isolamento	Virulência do isolado
CHV1A	EU11	Felgueiras	2018	Hipovirulento
CHV1B	EU11	Valpaços	2010	Hipovirulento
CHV1C	EU11	Chaves	2017	Hipovirulento
CHV1D	EU01	Vinhais	2016	Hipovirulento
13C	EU01	Cepões	2019	Virulento
29A	EU02	Arcos de Valdevez	2018	Virulento
1A	EU11	Arcos de Valdevez	2018	Virulento
23C	EU12	Arcos de Valdevez	2018	Virulento
8A	EU66	Cepões	2019	Virulento

2.4 Determinação dos grupos de compatibilidade vegetativa (VCtypes)

A determinação dos grupos de compatibilidade vegetativa (VCtypes) dos isolados com características virulentos de *C. parasitica* foi efetuada de acordo com a resposta Barreira versus Fusão proposta por Anagnostakis *et al.* (1986). O pareamento foi realizado com isolados europeus de referência (EU Testers) já identificados em Portugal, EU-01, EU-02, EU-11, EU-12 e EU-66 (Figura 11). Dividiram-se placas de Petri de 90mm com meio PDA em cinco partes iguais e com o auxílio de palitos esterilizados inoculou-se os esporos dos isolados virulentos e dos VCtypes a 2-3mm de distância junto da marcação das divisões das placas. A compatibilidade vegetativa foi avaliada após setes dias de incubação às escuras seguidos exposição durante 5 dias à temperatura ambiente e luz do laboratório.



Figura 11. Estirpes Europeias de referência usadas nos testes de compatibilidade vegetativa (EU-11, EU-02, EU-66, EU-12 e EU-01).

2.5 Identificação molecular dos isolados hipovirulentos

Para a identificação molecular dos isolados com características hipovirulentas (micélio branco), foram utilizados os protocolos do Laboratório de Sanidade Vegetal da Escola Superior Agrária de Bragança, que seguidamente se descrevem.

2.5.1 Extração de DNA

Para a identificação molecular dos isolados brancos, começou-se por fazer extração do DNA, utilizando o kit REDE Extract-N-Amp™ Plant PCR Sigma-Aldrich. Os isolados selecionados foram colocados a crescer previamente em meio de cultura PDA durante 5 dias. Para realizar a extração de DNA foram seguidos os seguintes passos:

- Com a ajuda de uma lâmina de bisturi estéril, recolher uma pequena amostra de micélio do fungo e colocar num tubo eppendorf de PCR, de modo a cobrir o fundo do tubo.
- Adicionar 20 µl de solução de extração, de modo a cobrir a amostra. Macerar a amostra com a ajuda da ponta da micropipeta.
- Incubar a 95° C durante 10 minutos num termociclador (T100 Thermal Cycler, Bio Rad).
- Adicionar 50 µl da solução de diluição a cada tubo e agitar.

2.5.2 Amplificação PCR

Para a identificação dos fungos utilizou-se a amplificação da região ITS (Espaçador transcrito interno), utilizando dois primers específicos ITS1 (5'- TCCGTAGGTGAACCTGCGG -3') e ITS4 (5'- TCCTCCGCTTATTGATATGC -3'). As regiões ITS são sequências com muita variabilidade e, por isso, permitem distinguir entre espécies semelhantes. Para a amplificação PCR, foram adicionados os seguintes reagentes num tubo de PCR (volume total 20 µl):

Reagente	Volume/amostra
REDE Extract PCR mix	10 µl
Primer ITS 1	1 µl
Primer ITS 4	1 µl
H ₂ O ultra pura	6 µl
DNA (extraído)	2 µl
Volume total	20 µl

No controlo negativo foi utilizada água ultra pura esterilizada em vez de DNA. A amplificação foi realizada num termociclador com as seguintes condições: desnaturação inicial a 94°C durante 4 minutos, seguida de 40 ciclos que consistiam na desnaturação a 94°C durante 30 segundos, o anelamento a 50°C durante 1 minuto e alongamento a 72°C durante 1 minuto. Seguiu-se uma etapa de alongamento final durante 10 minutos a 72°C, e as amostras foram mantidas a 4°C até utilização.

2.5.3 Visualização dos fragmentos amplificados

A visualização dos fragmentos de PCR amplificados foi feita através de eletroforese em gel de agarose a 1,5% com tampão TAE 1%. Ferveu-se num balão Erlenmeyer 0,9 gr de agarose em 60 ml de TAE e adicionou-se 1,2 µl de GelRed Nucleic Acid (2µl/100ml). Depois verteu-se no suporte de eletroforese deixando arrefecer até solidificar. As amostras de DNA de cada isolado em estudo foram depositados no respetivo poço, e a eletroforese decorreu durante 50 minutos a 80 V. Como marcador do tamanho molecular, incluiu-se no gel um marcador molecular 1Kb DNA Ladder, Promega.

Os produtos do PCR amplificados foram enviados para sequenciação. Para identificação dos fungos as sequências obtidas foram comparadas com sequências da base de dados do NCBI (Nacional Center for Biotechnology Information) através do Genbank usando o programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool).

2.6 Detecção e identificação molecular do hypovírus (CHV1)

2.6.1 Extração de RNA

Para a extração de RNA foi utilizado o kit PlantFungal Total RNA Purification kit (Norgen Biotek Corp). Foram selecionados 10 isolados com características morfológicas que podiam pertencer a estirpes hipovirulentas, nomeadamente, cor branca e reduzida quantidade ou ausência de esporos e isolados de referência. As amostras foram preparadas seguindo os seguintes passos:

- 1) Recolher 40 mg de micélio liofilizado e adicionar 600 µl de Lysis Buffer MM (144 µl de β-Mercaptoethanol + 14,4 ml de Lysis Buffer). Fazer um vortex de 20s. Centrifugar 2 minutos a 14.000 rpm.
- 2) Transferir o sobrenadante para um tubo novo (RNASE free tube). Adicionar ao tubo o mesmo volume de etanol 100%. Misturar por vortex.
- 3) Transferir 600 µl da solução para um novo tubo do kit (spin columns). Centrifugar 1 minuto a 14.000 rpm. (Repetir se necessário).
- 4) Descartar o sobrenadante em um novo tubo com coluna (spin columns). Adicionar 400 µl de wash Solution na coluna. Centrifugar 2 minutos a 14.000 rpm.
- 5) Descartar o sobrenadante e adicionar 400 µl de wash Solution. Centrifugar 1 minutos a 14.000 rpm.
- 6) Descartar o sobrenadante e adicionar 400 µl de wash Solution. Centrifugar 1 minutos a 14.000 rpm.
- 7) Descartar o sobrenadante e centrifugar durante 2 minutos a 14.000 rpm sem adicionar qualquer solução (para secar a coluna).
- 8) Transferir a coluna para um novo tubo de 1,7 ml presente no kit.
- 9) Adicionar 50 µl de Elution Buffer a coluna. Centrifugar 2 minutos a 2.000 rpm e centrifugar novamente 1 minuto a 14.000 rpm.
- 10) Descartar a coluna e guardar o tubo (-20°C).

O RNA obtido foi visualizado através de eletroforese em gel de agarose a 1,0% e tampão TBE. As amostras de RNA e o marcador molecular (1Kb DNA Ladder, Promega) foram

colocadas nos poços do gel (3 µl da amostra + 1 µl de corante azul + 2 µl de água ultra pura). A eletroforese decorreu durante 1 hora a 80V.

2.6.2 Identificação do vírus CHV1

Para a identificação do vírus CHV1 foi utilizado o RNA previamente extraído. Centrifugase o RNA a 11.000 rpm durante 4 minutos à temperatura ambiente. Depois faz-se uma diluição do RNA, utilizando microtubos, onde se coloca 3 µl de RNA Total e adiciona-se 11 µl de Water Nuclease-free (Thermo Fisher Scientific Baltics UAB, Vilnius, Lituania). Em seguida, colocar o microtubo no termociclador (T100 Thermal Cycler, Bio Rad) a 100°C durante 2 minutos. Para obtenção do cDNA foi realizado um PCR com as seguintes condições: 1 ciclo (1X) que consiste de desnaturação a 25°C durante 10 minutos, o anelamento a 50°C durante 30 minutos e a extensão a 85°C durante 5 minutos, 10°C infinito, num termociclador modelo T100 Thermal Cycler (Bio Rad). Posteriormente realiza-se um PCR para amplificação da região ORF A e ORF B do vírus utilizando o par de primers EP721-4 Rev (5'- GGAAGTCGGACATGCCCTG - 3') e hvep1F For (5'- TGACACGGAAGCTGAGTGTC - 3') para a região ORF A e o par de primers orfB-12aF For (5'- AGACCTCAATCGGGTCTCCCT - 3') e orfB-12aR Rev (5'- TTCAACCACACGACGAGTTTCG - 3') para a região ORF B.

O PCR realizou-se num termociclador modelo T100 Thermal Cycler (Bio Rad) segundo as seguintes condições: desnaturação inicial a 94°C durante 2 minutos, seguida de 33 ciclos que consistem na desnaturação a 94°C durante 1 minuto, o anelamento a 55°C durante 90 segundos e extensão a 72°C durante 2 minutos. Inclui-se uma extensão final a 72°C durante 8 minutos para completar os fragmentos de PCR que estiverem incompletos e em processo de extensão, 10°C infinito. Utilizou-se um controlo negativo (sem RNA) em cada PCR para detetar possíveis contaminações.

A visualização dos produtos de PCR amplificados foi feita por eletroforese em gel de agarose a 1,5% em tampão TBE a que se adicionou 2 µl gel red, e a eletroforese decorreu a 80 V. Como marcador molecular incluiu-se no gel o marcador 100 bp DNA Marker (Bioron).

2.7 Caracterização metabólica dos isolados de *C. parasitica*

O sistema Biolog FF MicroPlate (Biolog Inc) é utilizado para caracterizar fungos filamentosos de acordo com os seus perfis metabólicos (Anexo V). Esses perfis são obtidos a partir da utilização de 95 fontes de carbono de diferentes grupos químicos (aminas / amidas, aminoácidos, hidratos de carbono, ácidos carboxílicos, polímeros e outros compostos diversos) (Vieira *et al.*, 2019). Este método tem sido utilizado para identificar e auxiliar na definição de novas espécies de fungos com pequenas variações morfológicas, quando as técnicas moleculares são de aplicação limitada (Rice & Currah, 2005).

Os isolados de *C. parasitica* foram caracterizados ao nível metabólico, através da avaliação dos seus perfis metabólicos usando MicroPlacas Biolog FF (Biolog Inc), tendo sido estudados 9 isolados de *C. parasitica* que se referem no Quadro 5.

A caracterização metabólica destes isolados é importante para complementar bioensaios usados na seleção e caracterização de isolados para utilização como meio de luta biológica (Lopes *et al.*, 2012).

Quadro 5. Isolados de *Cryphonectria parasitica* utilizados na caracterização metabólica através de Microplacas Biolog FF.

Isolado	VC Type	Local de isolamento	Ano de isolamento	Virulência do isolado
CHV1A	EU11	Felgueiras	2018	Hipovirulento
CHV1B	EU11	Valpaços	2010	Hipovirulento
CHV1C	EU11	Chaves	2017	Hipovirulento
CHV1D	EU01	Vinhais	2016	Hipovirulento
13C	EU01	Cepões	2019	Virulento
29A	EU02	Arcos de Valdevez	2018	Virulento
1A	EU11	Arcos de Valdevez	2018	Virulento
23C	EU12	Arcos de Valdevez	2018	Virulento
8A	EU66	Cepões	2019	Virulento

2.7.1. Preparação de suspensão de esporos

As culturas puras de cada isolado foram cultivadas em meio PDA a 25 °C na ausência de luz durante 7 dias. Os isolados virulentos foram expostos à luz do laboratório para indução da

formação de esporos. No caso das estirpes hipovirulentas que não formam esporos em condições de luz natural, foi induzida a sua produção. Para tal, placas de PDA com micélio (7 dias a 25°) foram colocadas numa câmara de cultura durante 15 dias a 25°C, com fotoperíodo de 18 horas e de 10.000 lux.

O inóculo para as MicroPlacas FF foi preparado através da remoção dos esporos formados à superfície das placas de meio PDA, utilizando zaragatoas esterilizadas. Os esporos foram suspensos no fluido de inoculação FF (Cat. Nº 1006), pressionando a zaragatoa contra a parede do tubo, para libertação dos esporos. A concentração foi ajustada a um valor de transmitância de 75% a 590 nm, usando um turbidímetro Biolog, previamente calibrado, usando um padrão de turvação FF Biolog (Cat. Nº 3426). A suspensão de esporos (100 µL) foi adicionada a cada poço, e as MicroPlacas incubados a 25 °C na ausência de luz durante oito dias. A densidade óptica a 490 nm (atividade mitocondrial) foi determinada usando um leitor de microplacas ASYS UVM 340 (Hitech GmbH) para cada placa, em intervalos de 24 h durante 8 dias.

As leituras obtidas a partir dos poços de controlo (sem adição de qualquer fonte de carbono) foram subtraídas às leituras da absorvência dos restantes poços, para eliminar a cor de fundo gerada pela presença de substratos de carbono e da suspensão bacteriana adicionada. O valor médio de desenvolvimento da cor “average well color development”, (AWCD), resultante da oxidação de substratos durante a respiração do fungo, foi calculado dividindo a soma de intensidade da cor por 95, ou seja, o número de substratos presentes na microplaca, para cada um dos isolados, lidos às 24, 48, 72, 120, 144, 168 e 192 h.

Os dados das 95 fontes de carbono foram subdivididos em seis categorias de compostos químicos: aminas / amidas, aminoácidos, hidratos de carbono, ácidos carboxílicos, polímeros e outros compostos diversos (Zak *et al.*, 1994) e utilizados para análise da diversidade metabólica.

As fontes de carbono foram consideradas não utilizadas nos poços em que o desenvolvimento da cor era menor ou igual ao do controlo negativos (Vieira *et al.*, 2019).

2.8 Análise estatística

Foi realizada análise multivariada com o programa PAST v.3.26 para reduzir o número de variáveis resultantes dos perfis metabólicos, usando a Análise de Componentes Principais (PCA). Para a realização do mapa de calor (Heatmap) foi utilizado o programa Display R.

3. Resultados

3.1 Incidência do cancro do castanheiro nos soutos em estudo

A amostragem realizada nos quatro soutos mostrou a presença dos sintomas típicos da doença, como fendilhamento e coloração avermelhada da casca, presença de ramos mortos com permanência de folhas e ouriços, amarelecimento das folhas dos ramos acima do cancro, rebentação adventícia exuberante e presença de picnídios (Figura 12). Não se detetou, no entanto, em nenhum souto a presença de peritecas. Algumas árvores amostradas apresentavam micélio por baixo da casca de aspeto esbranquiçado e em forma de leque.

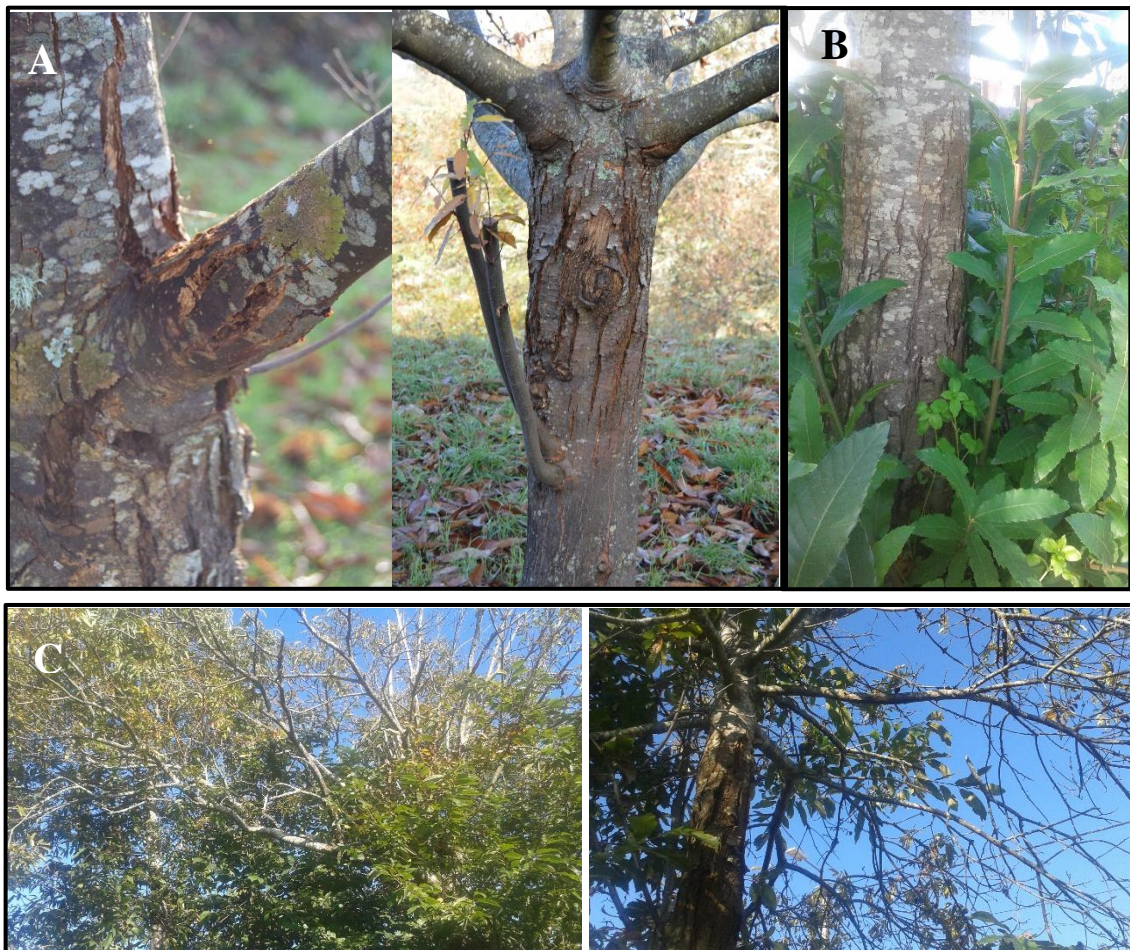




Figura 12. Sintomas do cancro do castanheiro observados nos soutos. A: Fendilhamento e coloração avermelhada da casca; B: Rebentação adventícia exuberante; C: Ramos mortos com permanência das folhas amarelecidas; D: Picnídios.

Verificou-se também a existência de vários cancros curados por hipovirulência natural (Figura 13). Em alguns castanheiros já não se encontravam sintomas do cancro, verificando-se apenas a existência de cancros curados nos troncos e ramos.



Figura 13. Cancros curados por hipovirulência natural observados nos soutos em estudo.

Os dados recolhidos durante a amostragem nos soutos encontram-se nos Anexos I a IV onde estão anotados o número da árvore, o grau de severidade da doença e as observações com as informações acerca do estado da infeção da árvore, nomeadamente, se apresentava cancros virulentos ou curados.

3.2 Georreferenciação e avaliação da severidade da doença

A localização dos castanheiros estudados nos quatro souts e a severidade da doença apresentam-se nas Figuras (14 a 21) De forma a avaliar a severidade da doença em cada souto, as árvores foram classificadas com base na aplicação da escala de severidade de 1 a 5 proposta por Juhásová e Bernadovičová (2001).

3.2.1 Souto de Crasto, Ponte da Barca

No souto de Crasto (Ponte da Barca) foram amostradas 34 árvores. A maioria dos castanheiros foi classificada com grau 2 e apenas 1 árvore com o grau 1 e 3 árvores sem viabilidade biológica (grau 5). As restantes foram classificadas com o grau 3.

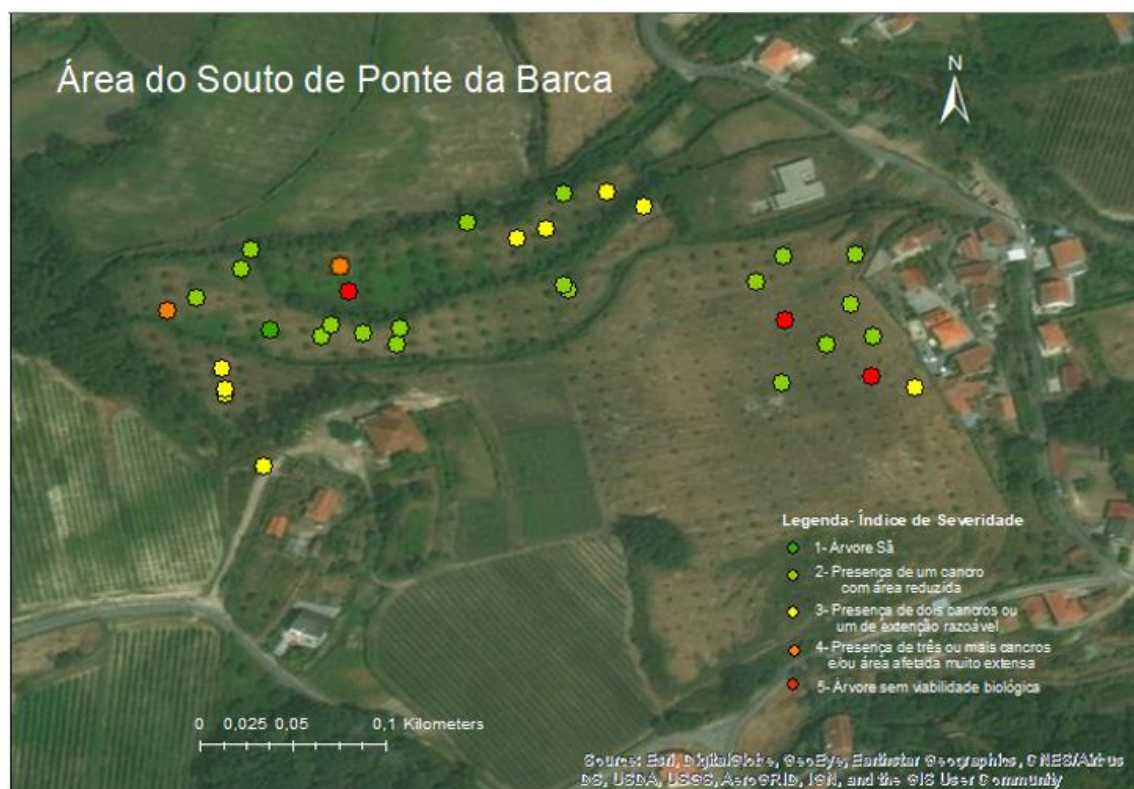


Figura 14. Vista aérea do souto de Crasto, Ponte da Barca, com os castanheiros estudados assinalados segundo o grau de severidade da doença, 2018.

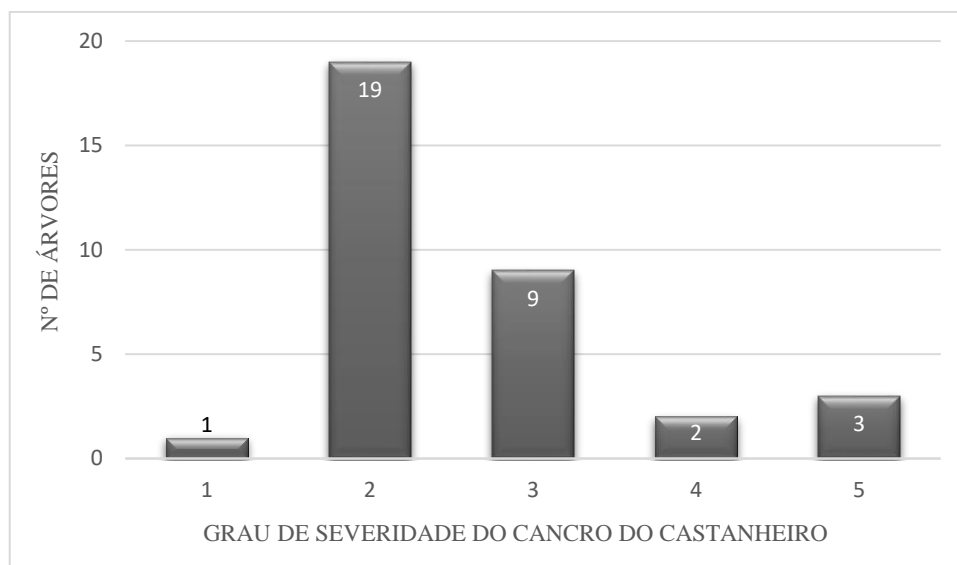


Figura 15. Severidade do cancro do castanheiro de acordo com escala de severidade de 1 a 5 proposta por Juhásová e Bernadovičová (2001), no souto de Crasto, Ponte da Barca, 2018.

3.2.2 Souto de Oleiros, Ponte da Barca

Considerando um total de 32 árvores amostradas no souto Oleiros (Ponte da Barca), apenas 5 não apresentavam sintomas da doença, não se verificando a existência de árvores sem viabilidade biológica. Na maioria dos castanheiros a doença manifesta-se com severidade de grau 2 e 4.

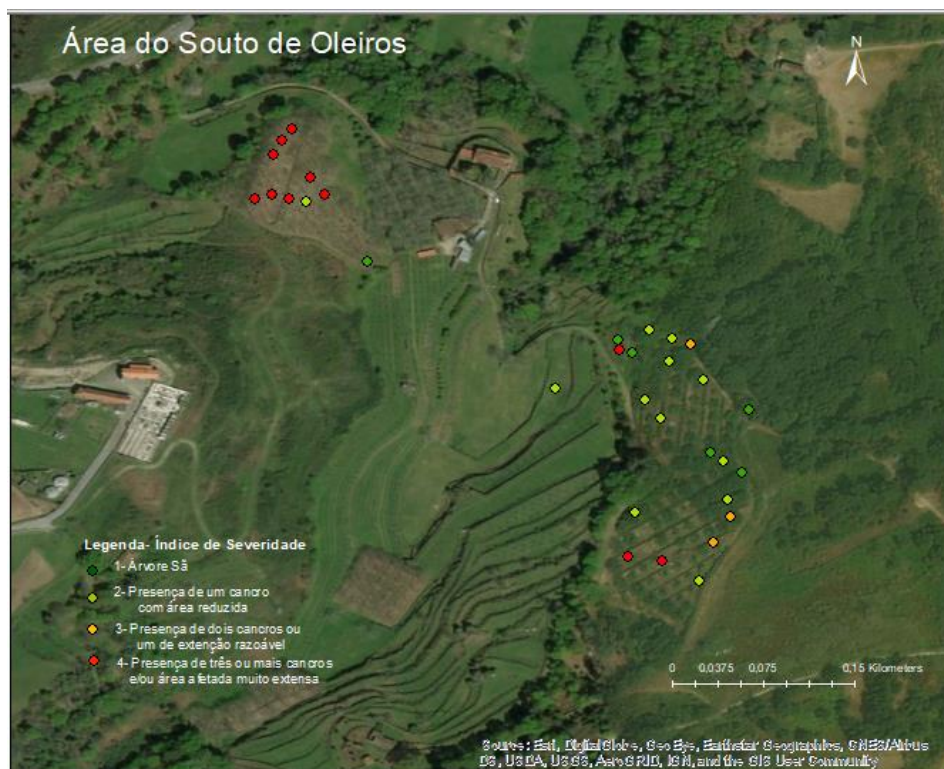


Figura 16. Vista aérea do souto de Oleiros, com os castanheiros amostrados assinalados segundo o grau de severidade da doença, 2018.

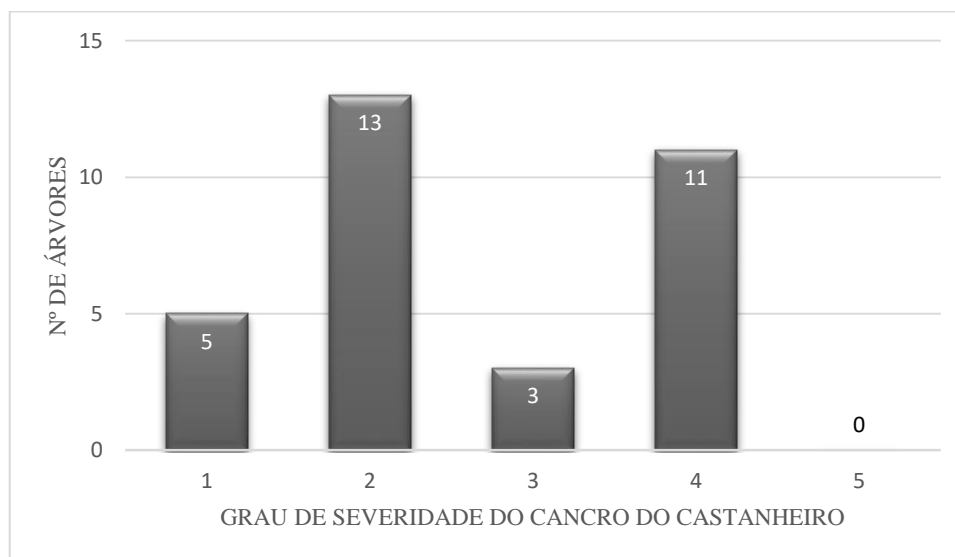


Figura 17. Severidade do cancro do castanheiro de acordo com escala de severidade de 1 a 5 proposta por Juhásová e Bernadovičová (2001), no souto de Oleiros, Ponte da Barca, 2018.

3.2.3 Souto de Cendufe, Arcos de Valdevez

No souto de Cendufe (Arcos de Valdevez), em 30 árvores amostradas metade estavam sãs, apresentado apenas cancos curados, e não se verificou a existência de castanheiros sem viabilidade biológica. As árvores mais afetadas pelo cancro foram classificadas grau 2 e grau 3, 9 e 6 árvores respetivamente.



Figura 18. Vista aérea do souto de Arcos de Valdevez, com os castanheiros amostrados assinalados segundo o grau de severidade da doença, 2018.

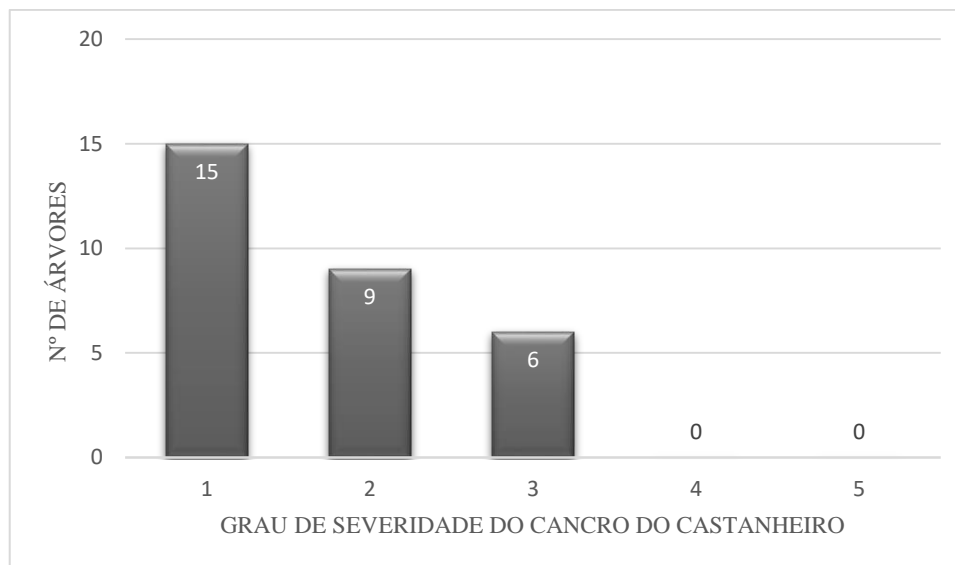


Figura 19. Severidade do cancro do castanheiro de acordo com escala de severidade de 1 a 5 proposta por Juhásová e Bernadovičová (2001), no souto de Cendufe, Arcos de Valdevez, 2018.

3.2.4 Souto de Cepões, Ponte de Lima

Os castanheiros do souto de Cepões (Ponte de Lima) apresentavam um grau de severidade da doença variável entre 1 e 4, não se tendo amostrado árvores sem viabilidade biológica (grau 5). Dos 33 castanheiros analisados, 5 foram classificados com o grau 1, 13 com o grau 2, 5 com grau 3 e 10 com o grau 4.

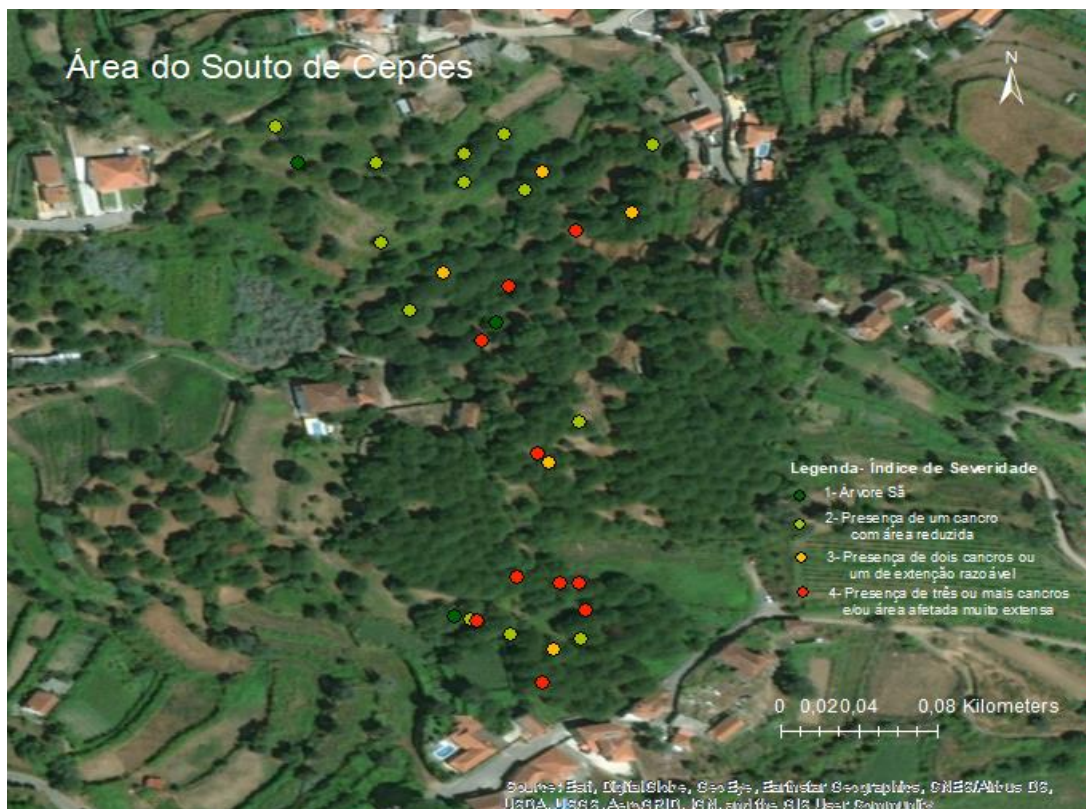


Figura 20. Vista aérea do souto de Cepões, com os castanheiros amostrados assinalados segundo o grau de severidade da doença, 2019.

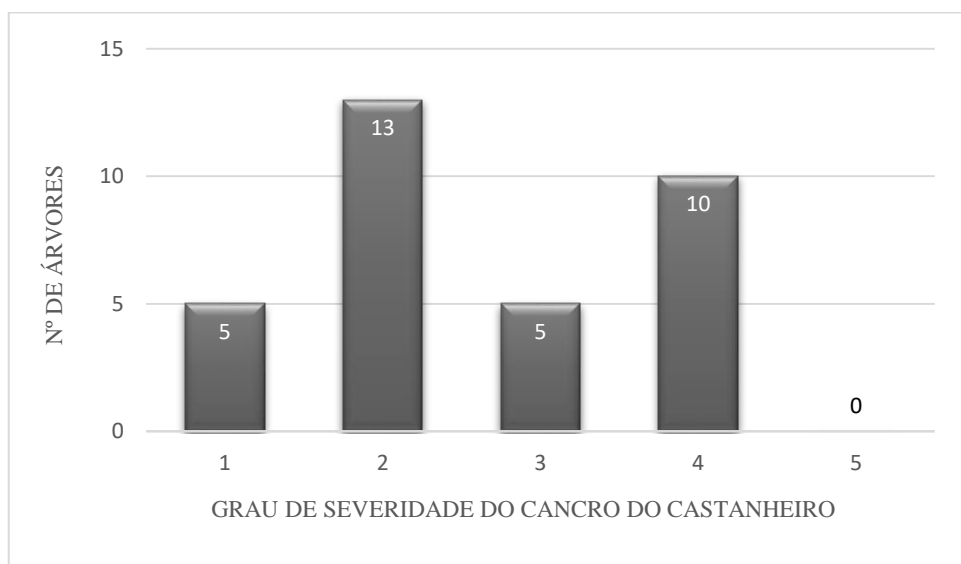


Figura 21. Severidade do cancro do castanheiro de acordo com escala de severidade de 1 a 5 proposta por Juhásová e Bernadovičová (2001), no souto de Cepões, Ponte de Lima, 2019.

De uma maneira geral, o grau de severidade mais comum nos soutos estudados foi o 2 (presença de um cancro com área reduzida) com 42% das árvores, depois o grau 1 (árvore

sã com cancos curados) e o grau 3 (presença de 2 cancos ou 1 de extensão razoável) com 19%, grau 4 com 18% e, por último, 2% com o grau 5. O soto menos afetado pela doença é o de Cendufe (Arcos de Valdevez), onde não se amostraram árvores como grau 4 e 5, e cerca de metade das árvores foram classificadas com o grau 1 por apresentarem apenas cancos curados por hipovirulência natural. Os sotos onde se verifica maior incidência da doença são o de Oleiros (Ponte da Barca) e Cepões (Ponte de Lima) que apresentavam uma classificação semelhante com destaque para um elevado número de árvores classificadas com o grau 4 (presença de 3 ou mais cancos) (Figura 22).

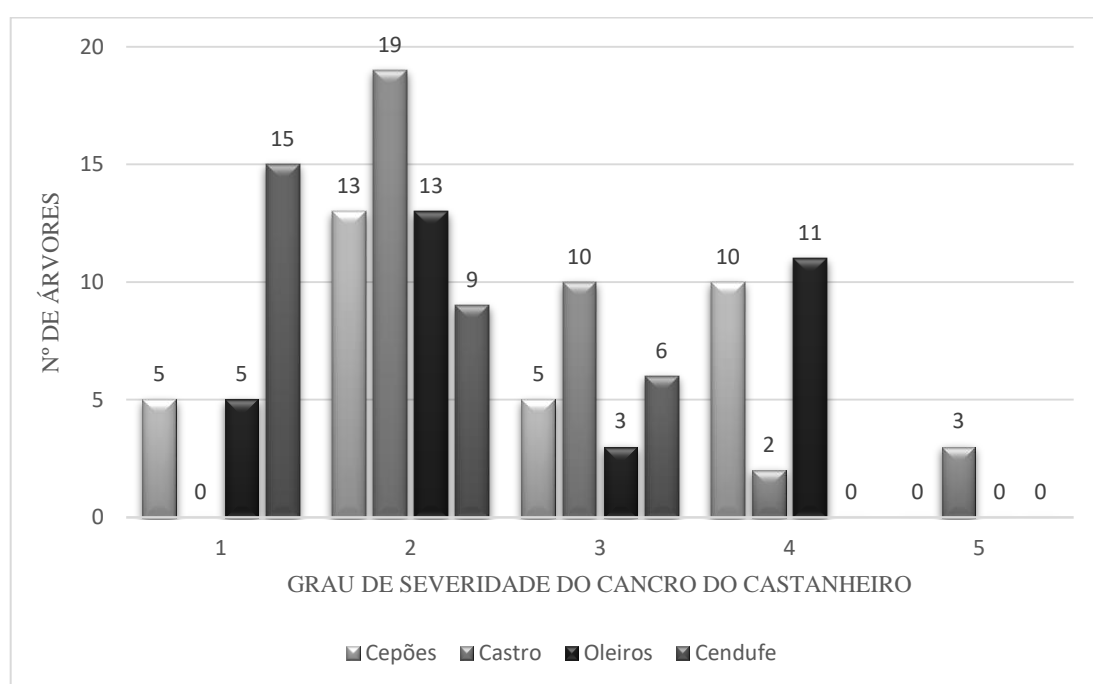


Figura 22. Severidade do cancro do castanheiro de acordo com escala de severidade de 1 a 5 proposta por Juhásová e Bernadovičová (2001), nos quatro sotos estudados no Minho em 2018-2019.

3.3 Identificação e caracterização dos isolados de *C. parasitica*

Dos quatro sotos foram isolados um total de 712 isolados, 133 no soto de Crasto (Ponte da Barca), 167 no soto de Oleiros (Ponte da Barca), 151 no soto de Cendufe (Arcos de Valdevez) e 261 no soto de Cepões (Ponte de Lima). Após isolamento e purificação em laboratório, os isolados de *C. parasitica* apresentavam diferentes características

morfológicas relativamente ao tipo de crescimento do micélio (regular ou irregular), coloração do micélio (amarelo, laranja ou castanho) e presença de esporos (Figura 23).

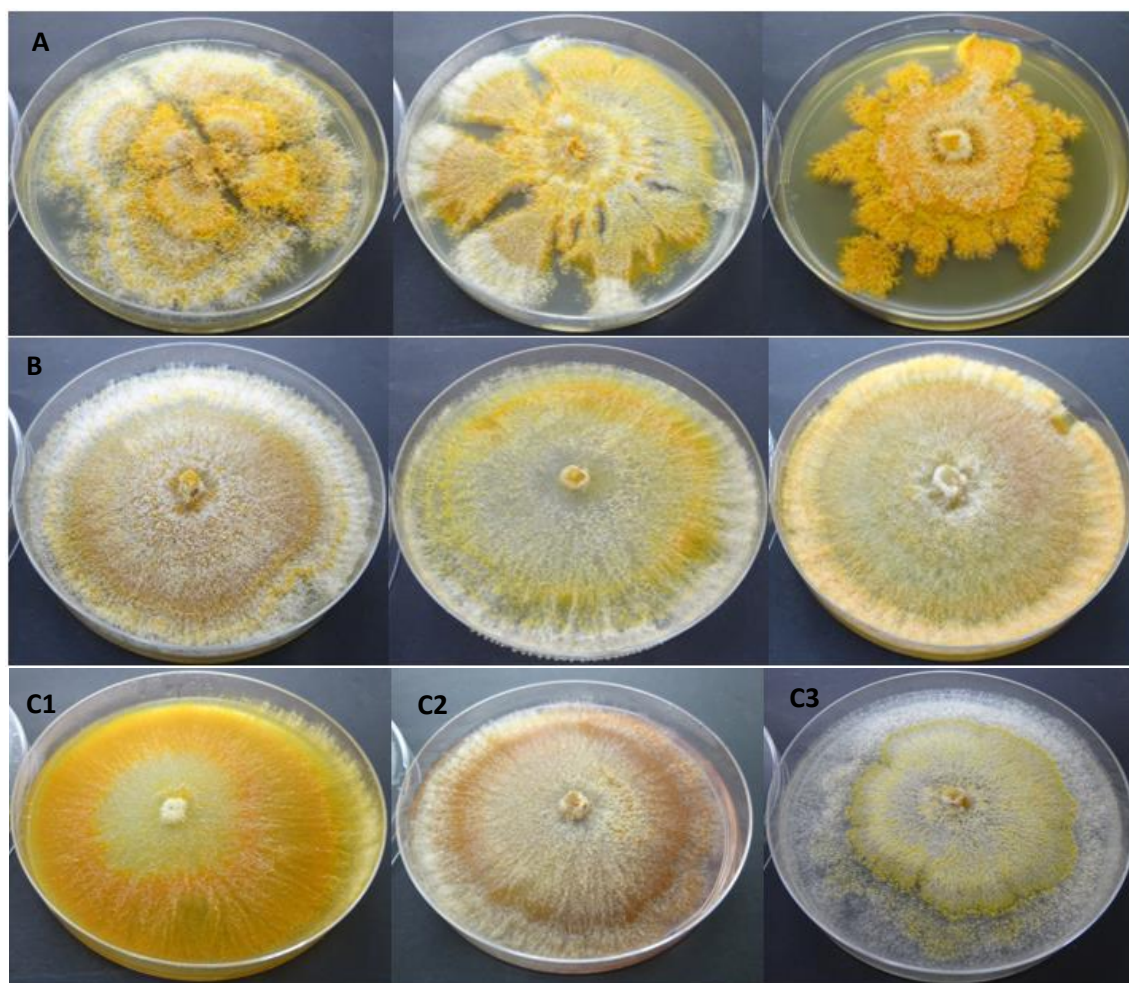


Figura 23. Isolados virulentos de *Cryphonectria parasitica* com diferentes morfologias de crescimento obtidos a partir de material vegetal recolhido nos soutos de Crasto, Oleiros, Cendufe e Cepões em 2018-2019. A: Crescimento irregular. B: Crescimento regular. C: Isolados com micélio de coloração laranja (C1), castanho (C2) e amarelo (C3).

Na figura 24 encontram-se alguns isolados com coloração branca e sem formação de esporos. Em todos os soutos, o crescimento do micélio foi maioritariamente regular embora se tenha verificado a existência de vários isolados com crescimento irregular do micélio (Figura 25).



Figura 24. Isolados com micélio branco e sem formação de esporos, descrito para estirpes hipovirulentas de *Cryphonectria parasitica* (2018-2019).

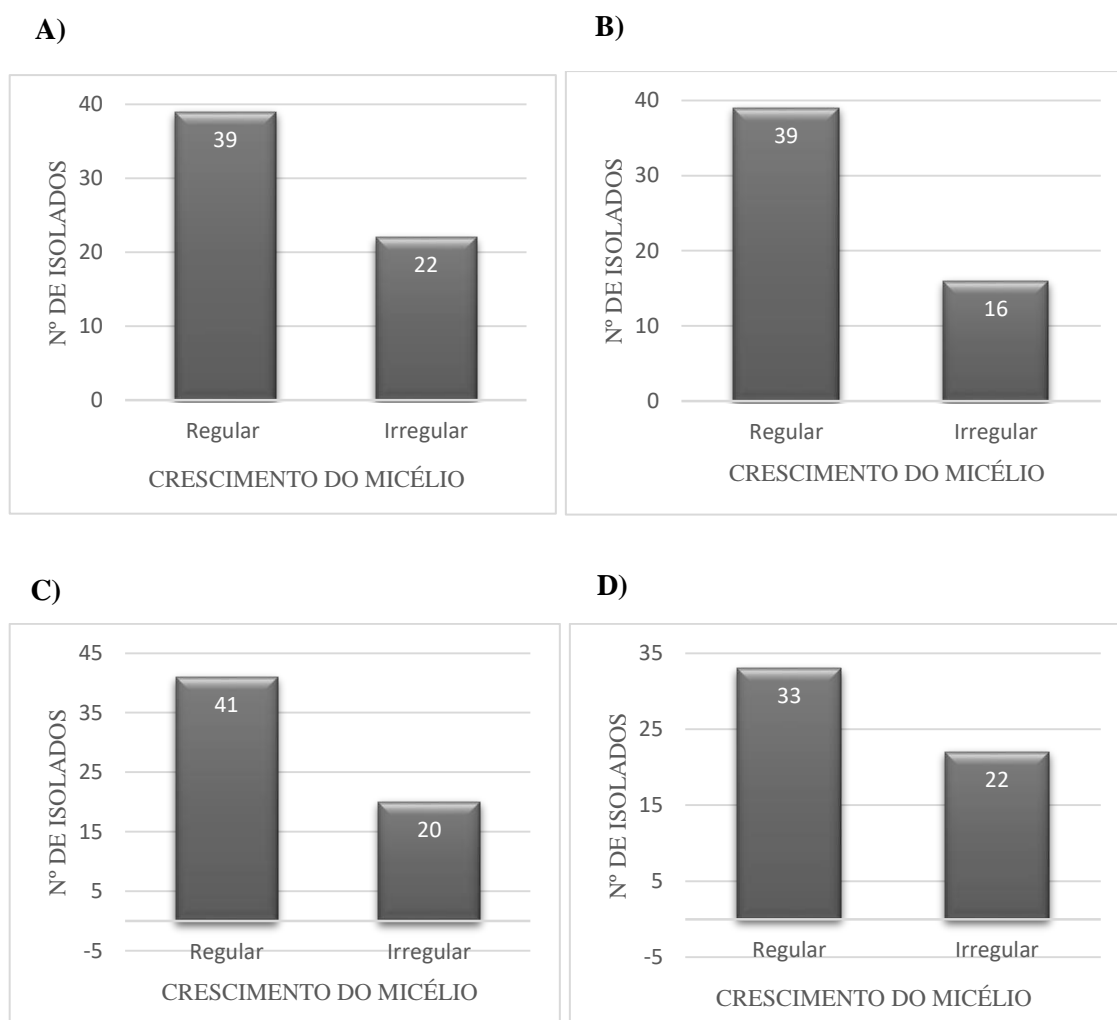


Figura 25. Classificação morfológica do crescimento do micélio dos isolados virulentos de *Cryphonectria parasitica* obtidos nos quatro sotos em estudo. A: Crasto, Ponte da Barca; B: Oleiros, Ponte da Barca; C: Cendufe, Arcos de Valdevez; D: Cepões, Ponte de Lima, 2019.

Quanto à coloração do micélio, foram caracterizados isolados de cor laranja, castanho e amarelo em todos os souts. A coloração predominante em todos os souts foi o laranja, seguido do castanho e do amarelo (Figura 26).

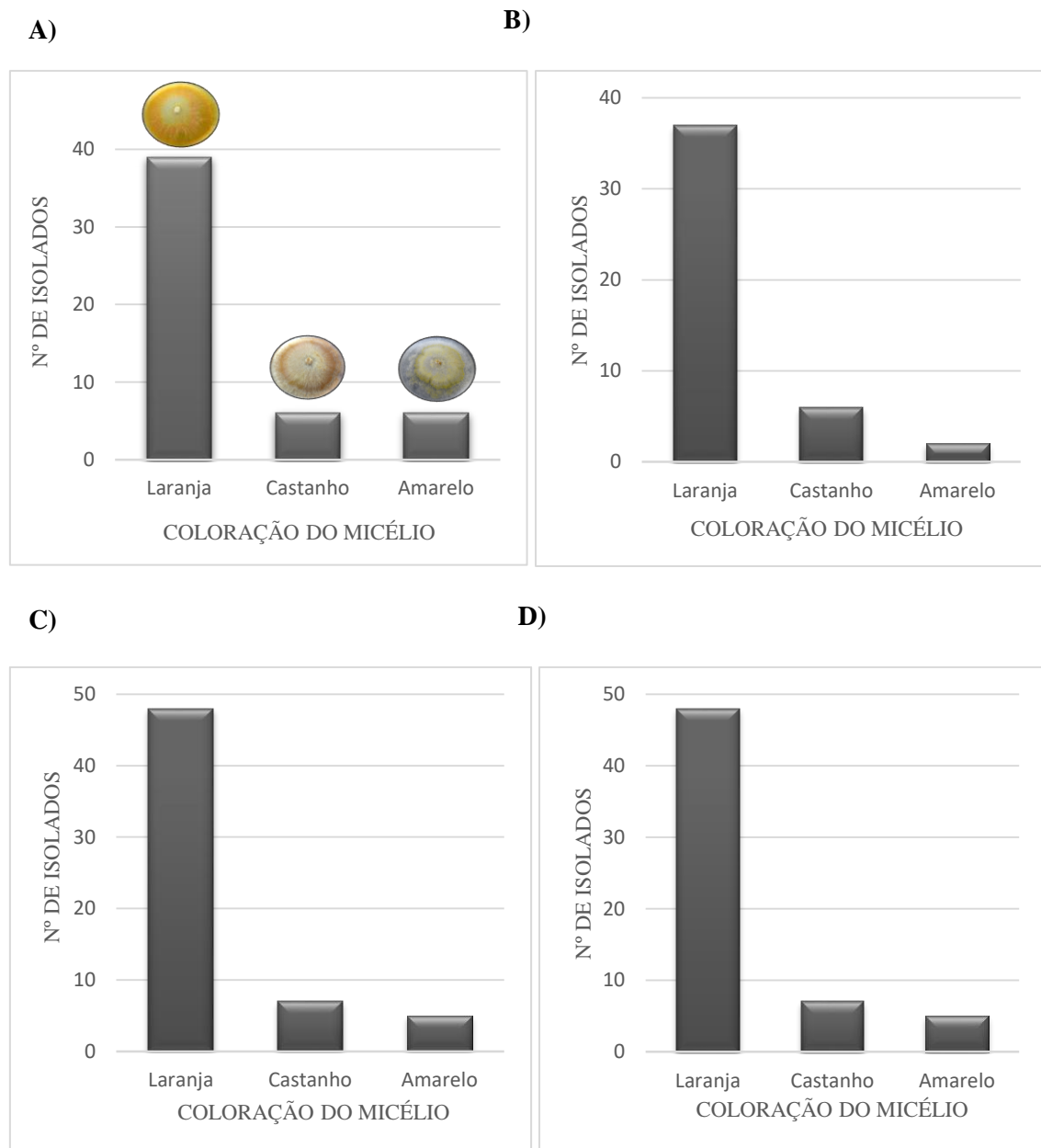


Figura 26. Classificação morfológica da pigmentação do micélio dos isolados virulentos de *Cryphonectria parasitica* obtidos nos quatro souts em estudo. A: Crasto, Ponte da Barca; B: Oleiros, Ponte da Barca; C: Cendufe, Arcos de Valdevez; D: Cepões, Ponte de Lima, 2019.

A avaliação do padrão de crescimento micelial radial de 4 isolados hipovirulentos e 5 isolados virulentos de *C. parasitica* encontra-se apresentado na figura 27. Verificou-se que a estirpe hipovirulenta CHV1A apresentou maior crescimento do micélio ao longo dos 7 dias, enquanto a estirpe virulenta EU11 apresentou o crescimento mais reduzido.

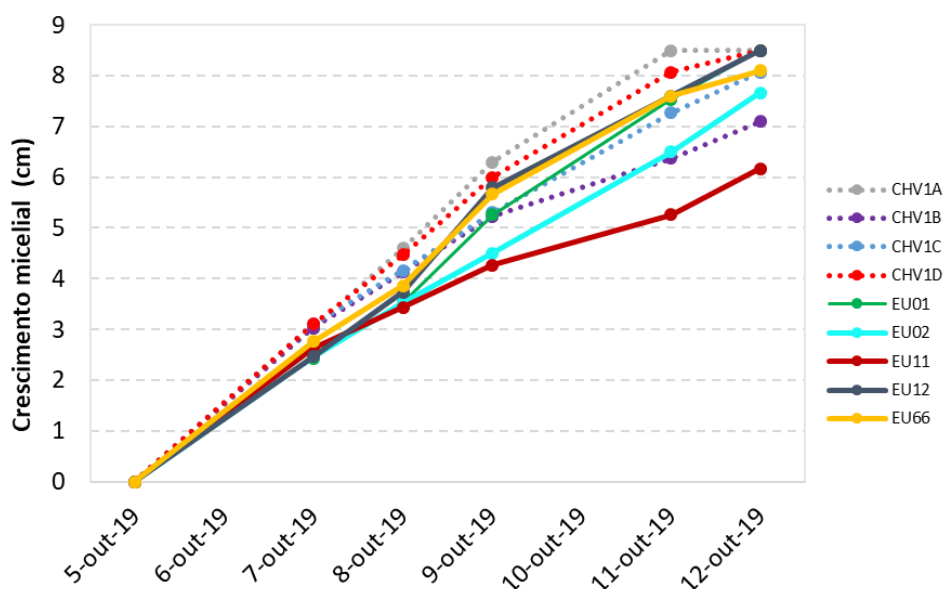


Figura 27. Crescimento micelial (cm) de isolados de *Cryphonectria parasitica* durante 7 dias, a 25° C na ausência de luz.

3.4. Outros fungos isolados a partir do material infetado

Foram isolados e purificados vários fungos que se encontravam também associados à madeira usada no isolamento de *C. parasitica*. Estes fungos apresentavam características morfológicas diversificadas quanto à coloração e crescimento do micélio (Figura 28).

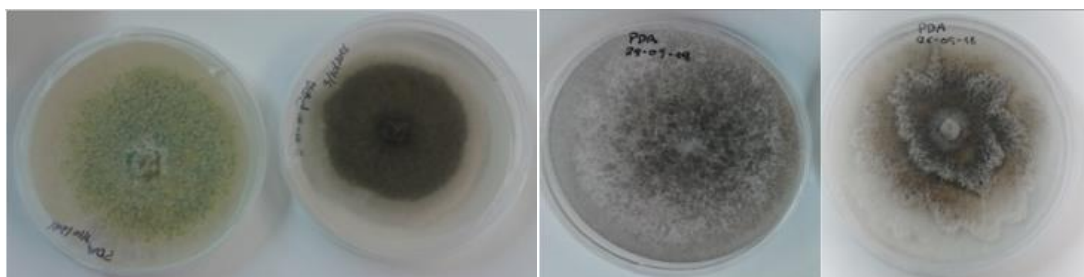


Figura 28. Diferentes fungos obtidos a partir de madeira infetada com *Cryphonectria parasitica*.

3.4 Determinação dos grupos de compatibilidade vegetativa

Para a determinação dos grupos de compatibilidade vegetativa considerou-se que dois isolados pertenciam ao mesmo grupo de compatibilidade vegetativa quando o micélio de ambos se juntava sem formar nenhuma barreira (Figura 29).

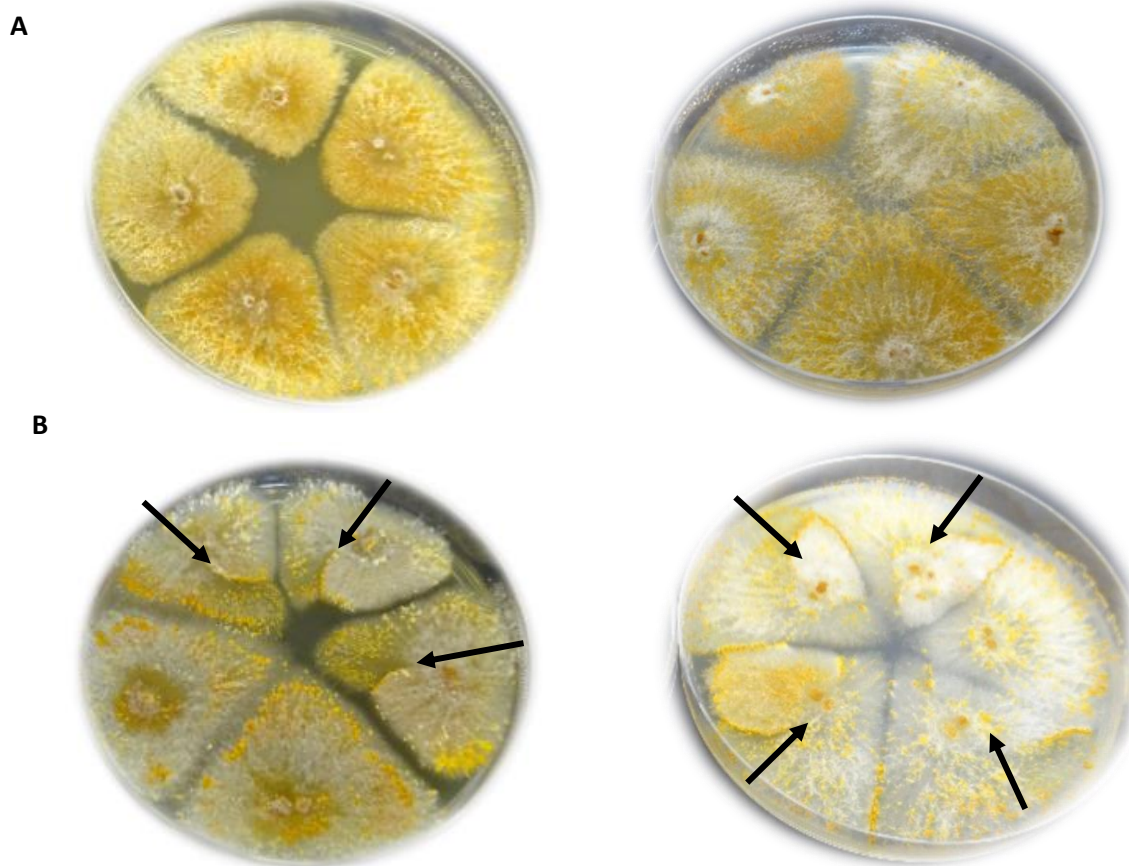


Figura 29. Exemplo de pareamentos entre os isolados de *Cryphonectria parasitica* obtidas nos soutos em estudo e as estirpes europeias de referência. A: Estirpes compatíveis. B: Estirpes incompatíveis assinaladas com uma seta.

Dos 712 isolados obtidos foram selecionados para a realização dos testes de compatibilidade 41 do souto de Crasto (Ponte da Barca), 44 do souto de Oleiros (Ponte da Barca), 51 do souto de Cendufe (Arcos de Valdevez) e 56 isolados do souto de Cepões (Ponte de Lima).

Após confrontação com os 5 Grupos de compatibilidade Vegetativa de referência, os resultados obtidos mostram que no souto de Crasto (Ponte da Barca), a maior percentagem

dos isolados (54%) não pertencia a nenhum dos VTypes em estudo ficando assim com o GCV por defenir. O VType com maior representatividade neste soto foi o EU-66 (20%), seguido do VType EU02 (12%) e os restantes VTypes apresentaram baixa representatividade (Figura 30).

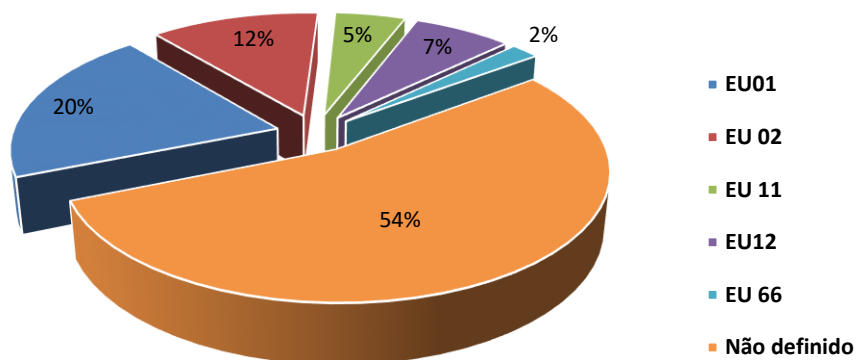


Figura 30. Percentagem de isolados de *Cryphonectria parasitica* em cada grupo de compatibilidade vegetativa no soto de Crasto, Ponte da Barca, 2019.

No soto de Oleiros, verificamos a presença de 4 VTypes. EU11 é o VType predominante (79%). Os outros grupos encontrados foram o EU12 (5%), EU66 (5%), enquanto 2% pertencentes ao VType EU01 e ainda um valor de 9% dos isolados sem grupo definido (Figura 31).

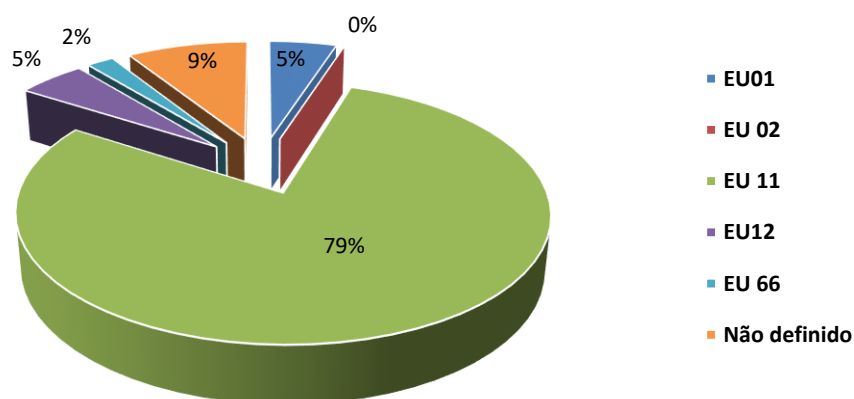


Figura 31. Percentagem de isolados de *Cryphonectria parasitica* em cada grupo de compatibilidade vegetativa no soto de Oleiros, Ponte da Barca, 2019.

No souto de Cendufe (Arcos de Valdevez) 82% dos isolados foram classificados como pertencentes ao VType EU11 e 6% dos isolados não foram incluídos em nenhum VType estudado (Figura 32).

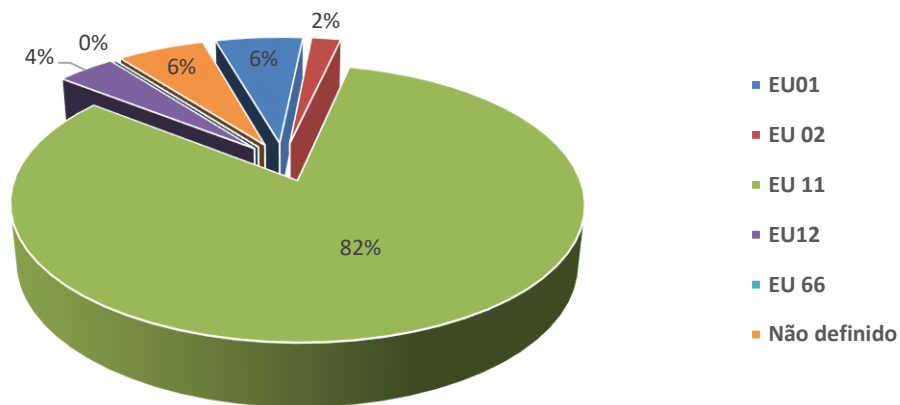


Figura 32. Percentagem de isolados de *Cryphonectria parasitica* em cada grupo de compatibilidade vegetativa no souto de Cendufe, Arcos de Valdevez, 2019.

Os resultados obtidos no souto de Cepões (Ponte de Lima) mostram que quase metade dos isolados (43%) não apresentou compatibilidade vegetativa com nenhum dos isolados estudados. O VType que se encontrava em maior percentagem (23%) foi o EU11 (Figura 33).

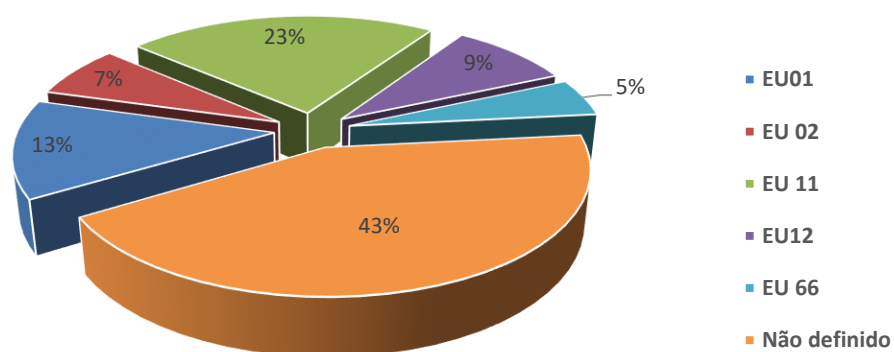


Figura 33. Percentagem de isolados de *Cryphonectria parasitica* em cada grupo de compatibilidade vegetativa no souto de Cepões, Ponte de Lima, 2019.

Os resultados da determinação dos GCV quatro souts em estudo encontra-se resumido na figura 34.

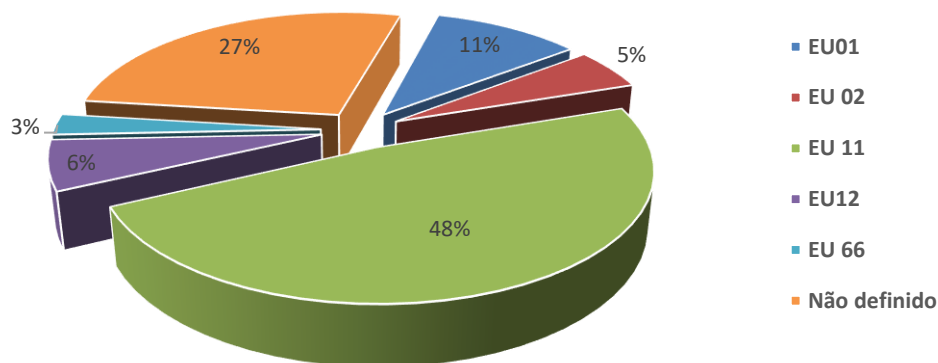


Figura 34. Percentagem de VCTypes nos quatro souts em estudo, 2019.

De uma maneira geral, o VCType mais representativo na região do Minho em 2018-2019 foi o EU11 (48%). Contudo 27% do total de isolados não foram incluídos em nenhum dos 5 grupos europeus testados. Devido à elevada percentagem de isolados sem VCType definido, realizou-se o pareamento entre esses isolados, tendo sido detetados nos 4 souts pelo menos 12 VCTypes diferentes dos 5 em estudo.

3.5 Identificação molecular dos isolados hipovirulentos

Em cada souto foram seleccionados alguns isolados que apresentavam cor branca e ausência de esporos para testar se eram isolados hipovirulentos de *C. parasitica* (Quadro 6).

Quadro 6. Isolados selecionados como possíveis estirpes hipovirulentas de *Cryphonectria parasitica*, obtidos nos souts quatro souts em estudo.

Nome do isolado	Origem
A18casca 2-inib2	Cendufe, Arcos de Valdevez
A 2H-2-4 Inib	Cendufe, Arcos de Valdevez
A27H-3 Inib	Cendufe, Arcos de Valdevez
A15V-3-inib	Cendufe, Arcos de Valdevez
Ol 8v-4.inib	Oleiros, Ponte da Barca
Ol 26v-6-inib	Oleiros, Ponte da Barca
B7V-2	Crasto, Ponte da Barca
B11V-4	Crasto, Ponte da Barca
Barca 33V-2-1	Crasto, Ponte da Barca
CE 1V-4	Cepões, Ponte de Lima

Para estes isolados, que apresentavam micélio de cor branca foi realizada extração de DNA e amplificação da região ITS. Os produtos PCR amplificados (figura 35) foram sequenciados para identificação ao nível da espécie.

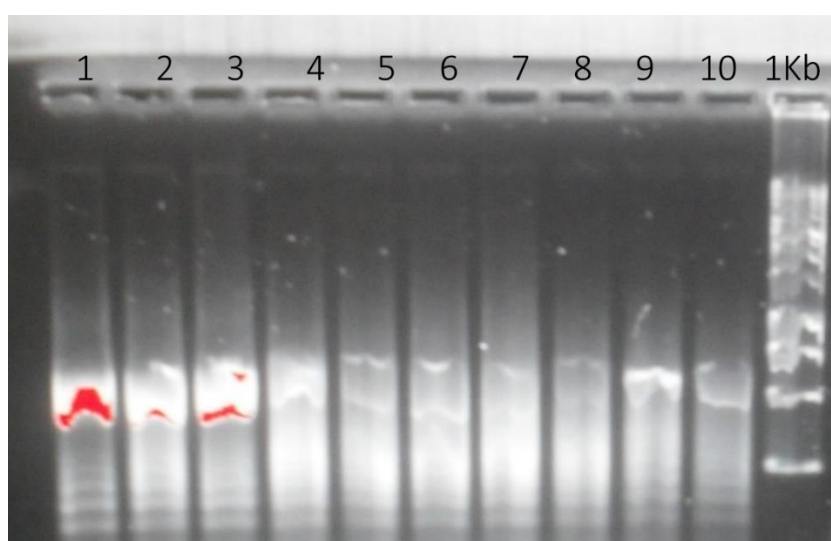


Figura 35. Gel de agarose apresentando os fragmentos de DNA amplificados com os primers ITS1 e ITS4 de 10 estirpes identificadas como possíveis estirpes hipovirulentas de *Cryphonectria parasitica*. 1: A18casca 2-inib2; 2: A 2H-2-4 Inib; 3: A27H-3 Inib; 4: B11V-4; 5:Ol 8v-4.inib, 6: Ol 26v-6-inib; 7: B7V-2; 8: CE 1V-4; 9: Barca 33V-2-1; 10: A15V-3-inib; 1Kb: Marcador molecular.

A identificação foi feita por comparação com sequências da base de dados GenBank através de uma análise BLAST, e os resultados encontram-se apresentados no quadro 7.

Quadro 7. Identificação de isolados a partir da sequência nucleotídica da região ITS.

Código do isolado	Espécie	Identidade nucleotídica %
A18casca 2-inib2	<i>Bjerkandera adusta</i>	99,16%
	<i>Agaricomycetes</i> sp.	99,16%
A27H-3 Inib	<i>Phlebia rufa</i>	99,67%
	<i>Phlebia acerina</i>	99,67%
Ol 8v-4.inib	<i>Pleurotus ostreatus</i>	99,31%
	<i>Pleurotus</i> sp.	99,48%
Ol 26v-6-inib	<i>Phanerochaete livescens</i>	99,83%
B7V-2	<i>Phanerochaete</i> sp.	98,76%
	<i>Phanerochaete cumulodentata</i>	98,59%
CE 1V-4	<i>Stereum</i> sp.	91,06%
	<i>Mycosphaerella aurantia</i>	91,23%
Barca 33V-2-1	<i>Peniophora rufomarginata</i>	98,08%
	<i>Peniophora incarnate</i>	97,06%
A15V-3-inib	<i>Trametes versicolor</i>	99,30%

A sequenciação dos produtos PCR dos isolados A 2H-2-4 Inib e B11V-4 não permitiu a identificação de nenhuma espécie conhecida e dos restantes isolados sequenciados nenhum pertencia à espécie *C. parasitica*, pelo que para estes isolados não se prosseguiu com a pesquisa da deteção e identificação de hipovírus (CHV1).

3.6 Microplacas BIOLOG: caracterização de perfis metabólicos

As 4 estirpes hipovirulentas (CHV1A, CHV1B, CHV1C e CHV1D) e 5 estirpes virulentas (EU01, EU02, EU11, EU12 e EU66) de *C. parasitica* foram caracterizadas com base nos perfis metabólicos obtidos através do sistema BIOLOG a partir de 95 fontes de carbono. O número de compostos de carbono utilizado pelas diferentes estirpes foi variável e nenhum utilizou todos os tipos de substratos.

O resultado da utilização dos compostos de carbono das 9 estirpes de *C. parasitica* estudadas ao longo de 192h apresentam-se na figura 36. Com exceção do isolado virulento EU02 todos

os restantes apresentaram maior intensidade na utilização de compostos, relativamente aos isolados hipovirulentos.

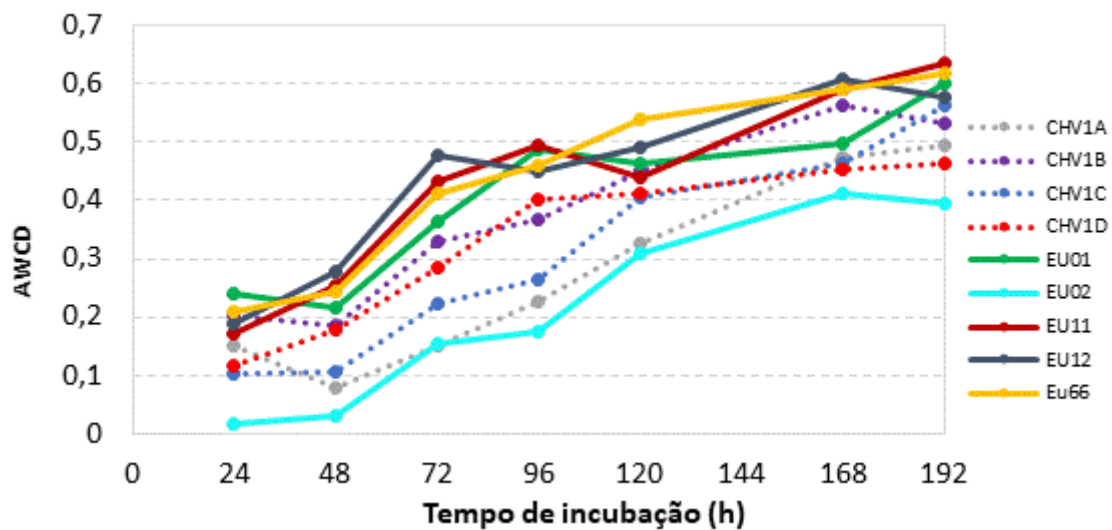


Figura 36. Valor médio de desenvolvimento da cor, resultante da oxidação de substratos durante a respiração do fungo, ao longo de 192 horas de incubação a 25°C.

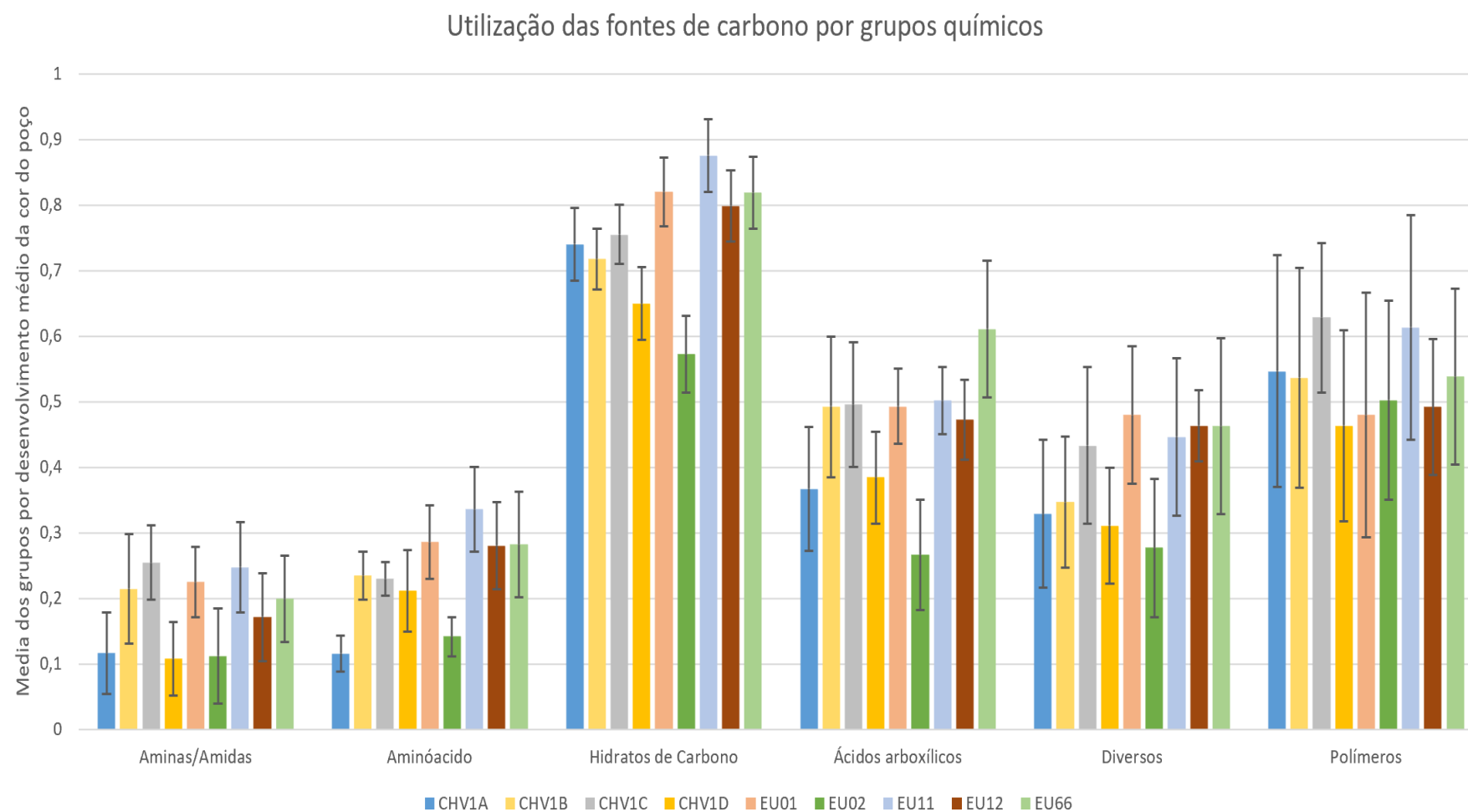


Figura 37. Gráfico da utilização de fontes de carbono, por grupos químicos, para os 9 isolados de *Cryphonectria parasitica* após oito dias de incubação a 25°C.

De uma maneira geral, os hidratos de carbono foram os compostos mais utilizados por todas as estirpes. O mapa de calor, apresentado na figura 38, mostra a utilização das fontes de carbono pelos isolados de *C. parasitica*.

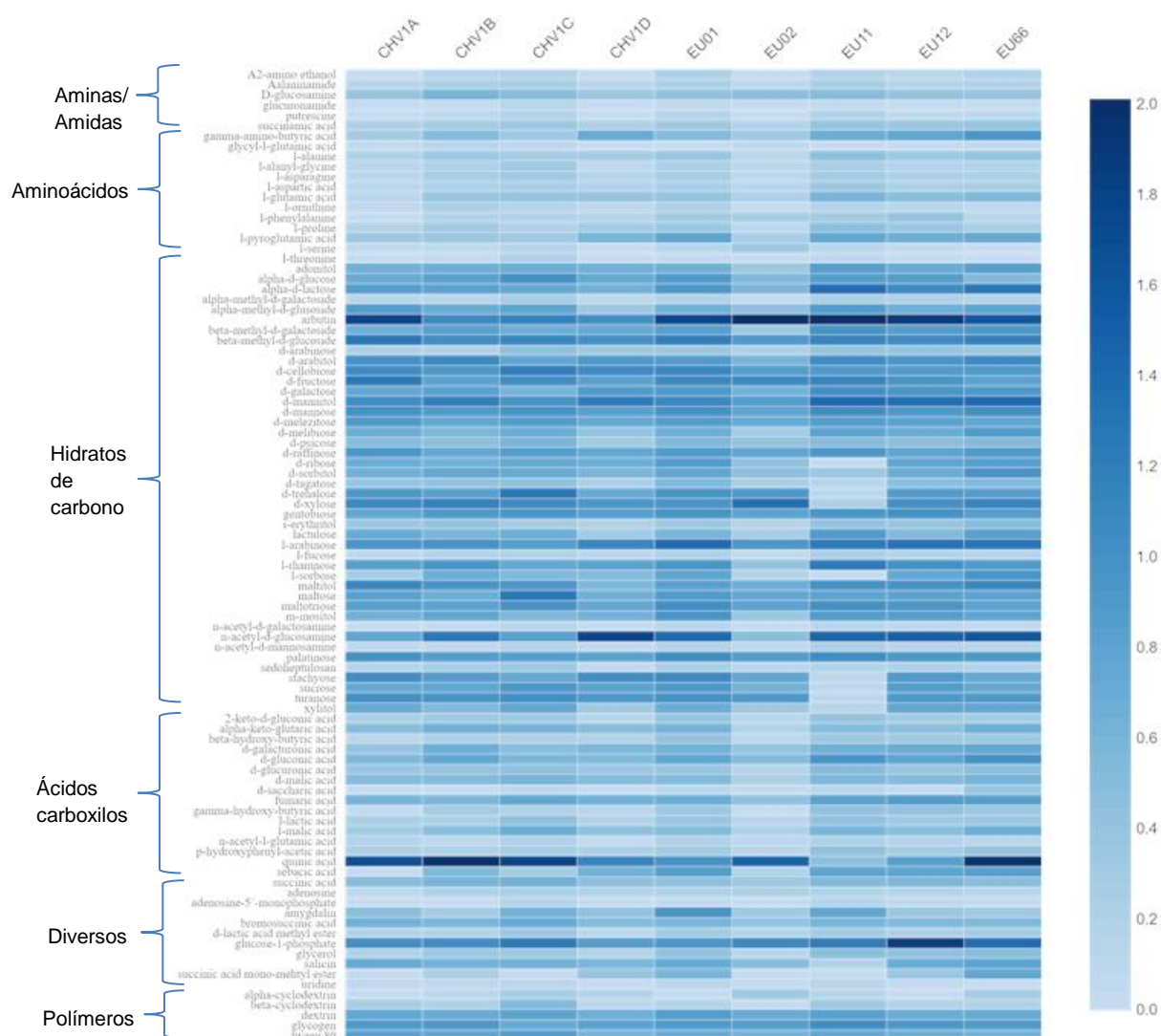


Figura 38. Mapa de calor da utilização das 95 fontes de carbono pelas nove estirpes de *Cryphonectria parasitica*, usando MicroPlacas Biolog FF.

A análise dos componentes principais (Figura 39) mostra que as estirpes estudadas apresentaram grandes diferenças nos seus perfis metabólicos, estando localizados em diferentes quadrantes. As estirpes mais relacionadas entre si são EU66, EU01 e EU12 no primeiro quadrante; CHV1B, CHV1C e CHV1D no segundo quadrante; e CHV1A e EU02

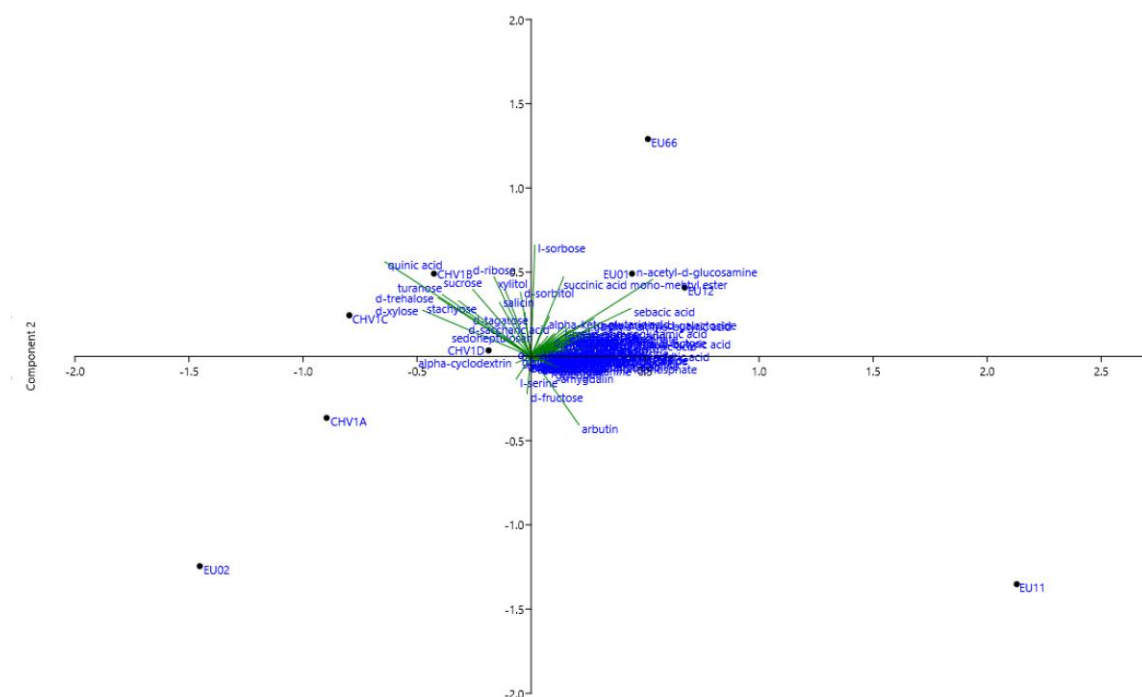


Figura 39. Análise dos componentes principais da utilização das fontes de carbono obtida através das Biolog FF MicroPlates para os nove isolados de *Cryphonectria parasitica* testados.

Quadro 8. Componentes principais: Eigenvalue e variância.

PC	Eigenvalue	% Variância
1	1.15	38.12
2	0.74	24.35
3	0.38	12.50
4	0.25	8.34
5	0.23	7.52
6	0.13	4.25
7	0.09	3.04
8	0.06	1.88

4. Discussão

A amostragem realizada nos quatro souts em estudo mostrou que a doença se encontra disseminada na região do Entre Douro e Minho. Em todos os souts se observou a existência de árvores com cancos virulentos, várias com mais do que um cancro, e árvores que apresentavam cancos curados com feridas de aspeto necrosado, debaixo das quais se observava o crescimento de novos tecidos sãos. Para a realização do estudo foram escolhidos quatro souts na região do Minho: Castro e Oleiros (Ponte da Barca), Cendufe (Arcos de Valdevez) e Cepões (Ponte de Lima). Foi possível observar vários sintomas da doença, como a existência de ramos mortos com ouriços e folhas amarelecidas, rebentação adventícia exuberante nas árvores mais afetadas, fendilhamento e coloração avermelhada na região afetada pelo cancro e também a presença de picnídios em várias árvores. A disseminação da doença terá ocorrido por dispersão natural das estruturas reprodutoras sexuadas (peritecas) e assexuadas (picnídios) de *C. parasitica*, por ação do vento, chuva ou através de insetos e aves. Os cortes provocados pela poda podem também ter ajudado à disseminação da doença, principalmente se não houver desinfecção das ferramentas utilizadas. A existência de vários castanheiros jovens infetados pela doença sem que tenham havido praticamente condições para contaminação local, parece sugerir que os castanheiros tenham vindo contaminados do viveiro. Em todos os souts existiam árvores com picnídios, o que pode ser explicado pelo facto de a recolha do material vegetal ter ocorrido no Outono, época mais favorável para a reprodução do fungo (Gouveia *et al.*, 2005). Não se encontrou em nenhum soto a presença de peritecas. Apesar de os souts apresentarem uma elevada incidência de cancos, verificou-se também a existência de vários cancos curados por hipovirulência natural. Isto pode indicar que a doença já se encontrava presente nos souts há alguns anos, visto a hipovirulência normalmente surgir apenas depois de 10 a 25 anos da introdução da doença (Robin & Heiniger, 2001; Pereira *et al.*, 2015).

Dos 129 castanheiros amostrados nos 4 souts, 25 não apresentavam sintomas de cancro estando todas as árvores curadas por hipovirulência natural. O estudo da severidade mostrou que os souts mais afetados pela doença eram Oleiros e Cepões, tendo apresentaram resultados semelhantes. Nestes souts, apesar de não se ter amostrado nenhuma árvore com grau de severidade 5 (sem viabilidade biológica) cerca de um terço das árvores apresentavam três ou mais cancos (grau 4). O soto de Cendufe era o menos afetado, tendo metade das

árvores amostradas apenas cancos curados (grau 1). Por último, no soto de Crasto a severidade da doença variou entre 1 e 5, onde a maioria das árvores apresentava apenas um cancro.

Nos 4 sotos em estudo recolheram-se um total de 129 amostras, obtidas de cancos virulentos e cancos curados, que possibilitaram obter 712 isolados em laboratório.

Através da análise morfológica, separaram-se os isolados com características virulentas dos isolados com características hipovirulentas. A identificação molecular de alguns dos isolados com características hipovirulentas mostrou que nenhum pertencia à espécie *C. parasitica* e, por isso, não foi possível realizar a pesquisa de hipovírus (CHV1). Os isolados virulentos apresentavam uma grande diversidade morfológica quanto ao crescimento e coloração do micélio. Relativamente ao padrão de crescimento do micélio, verificou-se que a maioria dos isolados apresentava crescimento regular, mas em todos os sotos, se obtiveram isolados com crescimento irregular. A coloração do micélio era predominantemente laranja, mas também existiam alguns isolados com micélio castanho e amarelo. A avaliação do padrão de crescimento do micélio mostrou que o crescimento foi maior nas estirpes hipovirulentas CHV1A e CHV1D e na estirpe virulenta EU12. A estirpe que registou o menor crescimento foi a virulenta EU11.

A determinação dos grupos de compatibilidade mostrou que existem isolados de todos os 5 VCtypes. No soto de Cendufe, a baixa diversidade de VCtypes com predominância do EU11 (82%) parece ter facilitado a dispersão da hipovirulência natural pelo que metade das árvores estavam curadas. O soto de Oleiros, apesar de apresentar também baixa diversidade de VCtypes e predominância do EU11 (79%), ainda se verifica que cerca de um terço das árvores (34%) apresenta grau de severidade 4. E apenas 16% das árvores apresentavam unicamente cancos curados. Isto pode ser explicado pelo facto de a hipovirulência estar presente no soto há menos tempo e, por isso, ter ainda muitas árvores afetadas pela doença. Os sotos de Crasto e Cepões apresentaram baixa percentagem de árvores curadas. No soto de Crasto predomina o grau 2, enquanto em Cepões as árvores apresentam maior grau de severidade da doença (30% classificadas com grau 4), o que pode significar que a doença se encontra presente há mais tempo neste soto. Para além disso, estes dois sotos apresentam elevada diversidade de VCtypes o que pode dificultar a dispersão da hipovirulência natural. A transmissão do hipovírus ocorre para as estirpes virulentas de *C. parasitica* por anastomose das hifas apenas quando os isolados pertencem ao mesmo grupo de

compatibilidade vegetativa (VCtype) (Prospero & Rigling, 2013). Comparando os dois soutos situados no concelho de Ponte da Barca, verifica-se grandes diferenças. Enquanto o souto de Oleiros apresenta pouca diversidade de VCtypes e algumas árvores curadas, em Crasto verifica-se uma grande diversidade de VCtypes e apenas uma árvore curada. O facto de existir baixa diversidade facilita a dispersão do hipovírus no souto. Estes resultados indicam que provavelmente a doença está há mais tempo presente no souto de Oleiros e, por isso, já se observa o fenómeno da hipovirulência natural. Segundo Hoegger *et al.*, 2000, a baixa incidência da hipovirulência é observada em regiões onde *C. parasitica* se estabeleceu recentemente.

Nos soutos de Cendufe e Oleiros, a população virulenta apresentou baixa diversidade, tendo a maioria dos isolados sido incluídos no grupo EU11, 82% e 79%, respetivamente. Contrariamente, nos soutos de Crasto e Cepões, uma elevada percentagem de isolados (54% e 43%, respetivamente) não foram incluídos em nenhum dos grupos em estudo.

O EU11 é o VCtype mais representativo nos soutos estudados com 48%, facto pouco comum no resto da Europa, mas muito comum em Portugal. Estudos anteriores mostraram resultados semelhantes relativamente à predominância do VCtype EU11 em Portugal (Gouveia, 2001; Bragança, 2007; Moura *et al.*, 2015). O VCtype EU11 aparece frequentemente na província espanhola de Castilha y León (Zamora *et al.* 2012), está presente apenas em alguns locais na Itália (Cortesi *et al.*, 1996) e França (Robin *et al.*, 2009) mas de uma maneira geral, é um grupo minoritário na Europa (Gouveia *et al.*, 2016). Neste trabalho foram ainda identificados os VCtypes EU01 (11%), EU12 (6%), EU02 (5%) e EU66 (3%). De referir que 27% do total de isolados não foram incluídos em nenhum dos 5 grupos europeus testados. Em todos os soutos foram identificados os VCtypes EU11, EU12 e EU66. O VCtype EU01 foi identificado em Oleiros, Cepões e Castro, e o VCtype EU02 foi identificado nos soutos de Cepões, Castro e Cendufe. Verificou-se também que nos soutos de Crasto e Oleiros, ambos situados no concelho de Ponte da Barca, existe um VCtype em Castro que não existe em Oleiros (EU02). Os soutos de Cendufe e Oleiros são os que apresentam menor diversidade populacional de *C. parasitica* e, por isso, tem maior potencial para aplicação da hipovirulência como método de luta biológica. Soutos com baixa diversidade de VCtypes poderá favorecer a disseminação da hipovirulência, facilitando a recuperação dos castanheiros doentes, enquanto em soutos com elevada diversidade de VCtypes a probabilidade de transmissão do hipovírus no fungo é menor. Este estudo mostra que a

diversidade genética do fungo responsável pelo cancro do castanheiro *C. parasitica* aumentou em Portugal. Esta diversificação genética deve-se principalmente à introdução natural ou pelo homem de novos VCtypes.

A avaliação dos perfis metabólicos de 9 estirpes de *C. parasitica* usando MicroPlacas Biolog FF, mostrou que à exceção do isolado virulento EU01 todos os restantes apresentaram maior intensidade na utilização de compostos, relativamente aos isolados hipovirulentos. De uma maneira geral, os hidratos de carbono foram os compostos mais utilizados por todas as estirpes. Este método tem sido utilizado para identificar e auxiliar na definição de novas espécies de fungos com pequena variação morfológica, quando as técnicas moleculares são de aplicação limitada (Rice & Currah, 2005). A caracterização metabólica dos isolados de *C. parasitica* é uma ferramenta de estudo importante pois futuramente pode ajudar na deteção de dsRNA, devido à utilização de diferentes fontes de carbono por um isolado convertido, em relação à estirpe virulenta, e assim confirmar a transferência do hipovírus. Este método foi utilizado pela primeira vez em *C. parasitica* por Ouni (2019). No entanto, os resultados obtidos por Ouni (2019) não foram concordantes com os obtidos neste trabalho pois o autor verificou um maior consumo por parte das estirpes hipovirulentas estudadas. Isto pode estar relacionado com o facto de Ouni (2019) ter utilizado micélio do fungo para a inoculação das Microplacas Biolog FF, enquanto neste trabalho foram utilizados esporos de *C. parasitica*.

5. Conclusão

Este trabalho permitiu estudar a incidência e a severidade do cancro do castanheiro em quatro sotos da região do Entre Douro e Minho. Apesar de já existirem alguns estudos nesta região acerca da diversidade de grupos de compatibilidade vegetativa de *C. parasitica*, o trabalho realizado em 2018 e 2019 mostra que foram identificados os 5 VCtypes mais representativos em Portugal e pelo menos mais 12 grupos, que necessitam de ser caracterizados futuramente. Estes resultados demonstram a existência de uma elevada diversidade das populações de *C. parasitica* na região do Minho, o que representa uma condicionante para a implementação da luta biológica por hipovirulência como método de controlo da doença. No entanto, em todos os sotos se verificou a existência de cancros curados por hipovirulência natural que permitiu a recuperação dos castanheiros doentes. Os sotos de Arcos de Valdevez e Oleiros apresentavam baixa diversidade populacional de *C. parasitica*, sendo que a maior percentagem dos isolados pertence ao grupo EU11. Não foi possível isolar estirpes hipovirulentas de forma a estudar hipovírus CHV1. A presença de hipovirulência natural no nordeste de Portugal é muito importante para aplicação do tratamento biológico no combate da doença em Portugal. A formação de esporos em cancros infetados com o hipovírus é normalmente ausente ou rara e, por isso, a forma de dispersão do hipovírus não é clara (Robin *et al.*, 2009). Pensa-se que a dispersão ocorra por transporte de micélio através de ácaros, insetos ou aves entre as árvores, pelo que novos estudos de dispersão são necessários para se compreenderem os mecanismos que favorecem a dispersão do vírus nos sotos, de modo a fomentar essas condições e assim tornar a luta biológica por hipovirulência eficaz no controlo da doença.

6. Referências bibliográficas

- Abreu, C. (1992). Castanheiros: Uma saudade no futuro? *Finisterra* 27 (53-54): pp. 3-16.
- Aguín, O., Sainz, M. J., Montenegro, D. & Mansilla, J. P. (2011). Biodiversidad e hipovirulencia de *Cryphonectria parasitica* en Europa: implicaciones para el control biológico del cancro del castaño. *Recursos Rurais*, Nº 7, pp. 35-47.
- Aguin-Pombo, D. & Franquinho-Aguiar, A. M. (2018). A cultura do castanheiro na Madeira: Manual Prático. Universidade da Madeira, Funchal.
- Allemann, C., Hoegger, P., Heiniger, U. & Rigling, D. (1999). Genetic variation of *Cryphonectria hypoviruses* (CHV1) in Europe, assessed using restriction fragment length polymorphism (RFLP) markers. *Molecular Ecology* 8 (5): 843-854.
- Anagnostakis, S. (1987). Chestnut Blight: the classic problem of an introduced pathogen. *Mycologia* 79, 23-37.
- Anagnostakis, S.L., Hau, B. & Kranz J. (1986). Diversity of vegetative compatibility groups of *Cryphonectria parasitica* in Connecticut and Europe. *Plant Disease* 70, 536–8.
- Anagnostakis, S. (1988). *Cryphonectria parasitica*: cause of chestnut blight. *Advances in Plant Pathology*. Nº6, pp. 123-136.
- Anagnostakis, S. L., Chen, B., Geletka, L. M. & Nuss, D. L. (1998). Hypovirus transmission to ascospore progeny by field-released transgenic hypovirulent strains of *Cryphonectria parasitica*. *Phytopathology* 88:598-604.
- Araújo, P.V., Almeida, J.D., Lourenço, J., Clamote, F., Carapeto, A., Henriques, T.M., Pereira, E.P., Aguiar, C., *et al.* (2019). *Castanea sativa* Mill. - mapa de distribuição. Flora-On: Flora de Portugal Interactiva, Sociedade Portuguesa de Botânica. <http://www.flora-on.pt/#wCastanea+sativa>. Consultado a 7 de Julho de 2019.
- Borges, O., Gonçalves, B., Carvalho, J.L.S. de, Correia, P. & Silva, A.P. (2008) Nutritional quality of chestnut (*Castanea sativa* Mill.) cultivars from Portugal. *Food Chem.* 106: 976– 984.
- Bragança, M.H.P (2007). Chestnut blight in Portugal: spread and populational structure of *Cryphonectria parasitica*. Tese de Doutoramento, Lisboa, 136p.

Bragança, H., Simões, S., Onofre N., Tenreiro, R. & Rigling, D. (2007). *Cryphonectria parasitica* in Portugal: diversity of vegetative compatibility types, mating types, and occurrence of hypovirulence. For. Path. N°37 pp. 391-402.

Bragança, H. (2018). Cancro do castanheiro- prós e contras da luta biológica. Vida rural.

Câmara, M. S. (1929). Micotes aliquot novi allique in mycoflora lusitaneae ignoti. Revista Agronómica 17, 7.

Capelo J. & Catry, F. (2007). A distribuição do castanheiro em Portugal. Em: J. Silva (eds.) Árvores e Florestas de Portugal: Do Castanheiro ao Teixo. Fundação Luso-Americana para o Desenvolvimento. Lisboa.

Conedera, M., Tinner, W., Krebs, P., Rigo, D. & Caudullo, G. (2016). *Castanea sativa* in Europe: distribution, habitat, usage and threats. In: San-Miguel-Ayán, J., de Rigo, D., Caudullo, G., Houston Durrant, T., Mauri, A. (Eds.), European Atlas of Forest Tree Species. Publ. Off. EU, Luxembourg.

Cortesi, P.; McMulloch, C. E., Song, H., Lin, H., Milgroom, M. G. (2001). Genetic control of horizontal virus transmission in the Chestnut blight fungus, *Cryphonectria parasitica*. Genetics, 159, 107–118.

Costa, R., Santos, C., Machado, H., Correia, I., Gomes, F. & Gomes-Laranjo, J. (2011). Phenotyping *Castanea* hybrids for *Phytophthora cinnamomi* resistance. British Society for Plant Pathology 64-901-910.

Cronquist, A. (1968). The Evolution and Classification of Flowering Plants. Houghton Mifflin: Boston.

DGADR. (2019). Produtos tradicionais portugueses. <https://tradicional.dgadr.gov.pt/pt/produtos-por-regime-de-qualidade/dop-denominacao-de-origem-protegida?start=20>. Consultado a 10 de Agosto de 2019.

EPPO. (2005). Diagnostics. *Cryphonectria parasitica*. EPPO bulletin., 53:271- 273.

EPPO. (2019). *Cryphonectria parasitica* (ENDOPA) Disponível no site: <https://gd.eppo.int/taxon/ENDOPA/distribution>. Consultado a 10 de Outubro de 2019.

FAO. (2016). Food and Agriculture Organization of the United Nations. <http://faostat.fao.org/site/>. Consultado a 15 de Julho de 2019.

Gobbi, E. & Intropido, M. (1984). Esperienze di protezione biologica del castagno dal cancro corticale. 1° convegno nazionale "Problemi Jitopatologici delle piante forestali" Venezia-Mestre, pp. 93-96.

Gomes-Laranjo, J., Ferreira-Cardoso, J., Portela, E. & Abreu, C. G. (2007). Castanheiros. Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Qta de Prados, 5000-801 VILA REAL.

Gouveia, E., Cardoso, P. & Monteiro, L. (2001). Incidence of chestnut blight and diversity of vegetative compatible types of *Cryphonectria parasitica* in Trás-os-Montes (Portugal). Snow Landsc. Res. 76, 3: 387–390.

Gouveia, E., Coelho, V. & Azevedo, J., (2005). Epidemiologia do cancro do castanheiro da distribuição espacial de *Cryphonectria parasitica* (Murrill) Barr. 5° Congresso Florestal Nacional. Viseu. 12 pp.

Gouveia, E., Coelho, V. & Monteiro, L. (2010). Potential of local hypovirulent strains of *Cryphonectria parasitica* for biological control of chestnut blight. Acta Horticulturae. ISSN 0567-7572. 866, p. 443-448

Gouveia, E., Pereira, E., Araújo, A., Coelho, V., Castro, J., Bragança, H. & Martins, L. (2016). Cancro do Castanheiro em Trás-os-Montes (Portugal): Incidência atual e estudo da estrutura populacional de *Cryphonectria parasitica* para a introdução da luta Biológica por Hipovirulência. Gaia Scientia. Edição Especial Europa. Volume 10 (2): 75-83.

Gouveia, E., Torrent, I. & Coelho, V. (2017). Diversidade de microfungos presente nos ramos e troncos de castanheiro infetados por *Cryphonectria parasitica*. 8° Congresso Florestal Nacional.

Grente, J. (1965). Les formes hypovirulentes de *Endothia parasitica* et les espoirs de lutte contre le chancre du châtaignier. C. R. Seances Acad. Agric. Fr. 51, 1033–1037.

Griffin G. & J. Elkins (1986). Chestnut blight In: Roane M.K., G.J.Griffin, J.R. Elkins. Chestnut blight other Endothia diseases and the genus Endothia. APS Monograph Series, pp 1-26.

Hebard, F.V., Griffin, G.J. & Elkins, J.R., (1984). Developmental histopathology of cankers incited by hypovirulent and virulent isolates of *Endothia parasitica* on susceptible and resistant chestnut trees. Phytopathology 74, 140-149.

Heiniger, U. & Rigling, D. (1994). Biological control of chestnut blight in Europe. Annual Reviews of Phytopathology. 32: 581-589.

Heiniger, U. (1997). Le chancre de l'écorce du châtaignier. Notice pour le praticien. 2ème édition. p.7.

Hillman B.I., Fulbright D.W., Nuss D. L. & Van Alfen N. K. (2000). Hypoviridae. In Virus Taxonomy: Seventh Report of the International Committee for the Taxonomy of Viruses, pp. 515-20. San Diego: Academic.

Hillman, B.I. & Suzuki, N. (2004). Viruses of the Chestnut blight fungus, *Cryphonectria parasitica*. Advances in Virus Research. 63: 423-472.

Ibáñez, I., Pereira, E., Moura, L., Castro, J. P. & Gouveia, E. (2015). Dispersión natural de la Hipovirulencia en *Cryphonectria parasitica*. Un caso de estudio, Sergude - Minho – Portugal. Revista de Ciências Agrárias, 38 (2): 264-274

INE. (2018). Estatísticas Agrícolas. Instituto Nacional de Estatística, I.P. ISBN 978-989-25-0495-7.

Juhásová G. & Bernadovičová S. (2001). *Cryphonectria parasitica* (Murr.) Barr and Phytophthora spp. in chestnut (*Castanea sativa* Mill.) in Slovakia. For. Snow Landsc. Res. 76 (3): 373–377.

Kolp, M., Fulbright, D.W. & Jarosz, A.M. (2018). Inhibition of virulent and hypovirulent *Cryphonectria parasitica* growth in dual culture by fungi commonly isolated from Chestnut blight cankers. Fungal Biology N° 122, pp. 935-942.

Lopes, F.A.C., Steindorff, A.S., Geraldine, A.M., Brandao, R.S., Monteiro, V.N. & Silva, R.N. (2012). Biochemical and metabolic profiles of Trichoderma strains isolated from common bean crops in the Brazilian Cerrado and potential antagonism against Sclerotinia sclerotiorum. Fungal Biology 116: 815–824.

Macdonald, W.L. & Fulbright, D.W. (1991). Biological-Control of Chestnut Blight-Use and Limitations of Transmissible Hypovirulence. Plant disease, 75: 656-661.

Manion, P.D., (1981). Tree disease concepts. Prentice Hall, New Jersey, EEUU.

Marra, R.E. & Milgroom, M.G. (2001). The mating system of the fungus *Cryphonectria parasitica*: selfing and self-incompatibility. Heredity 86, p. 134-143.

Martins, L. M., Castro, J. P., Bento, R., Sousa J. (2015). Monitorização da condição fitossanitária do castanheiro por fotografia aérea obtida com aeronave não tripulada. Revista de Ciências Agrárias, 38 (2): 184-190

Milgroom, M.G. & Cortesi, P. (2004). Biological Control Of Chestnut Blight With Hypovirulence: A Critical Analysis. Annual Review of Phytopathology. N° 42: 311-338.

Moura, L., Pereira, G., Costa, S., Martins, M. & Gouveia, E. (2015). Cancro do castanheiro na região do Minho. Estrutura populacional e variabilidade genética de populações de *Cryphonectria parasitica*. Revista de Ciências Agrárias. Vol. 38 Nº2, pp.238-247.

Nuss, D.L. (2005). Hypovirulence: mycoviruses at the fungal-plant interface. Nature Reviews Microbiology 3: 632-642.

OEPP/EPPO. (2018). EPPO Alert List from: https://www.eppo.int/ACTIVITIES/plant_quarantine/alert_list. Consultado a 27 de Agosto de 2019.

Ouni, O.A. (2019). Characterization of ligninolytic enzymes and metabolic profile of *Cryphonectria parasitica* and the isogenic converted strains by CHV1 hypovirus. Tese de Mestrado. Instituto Politécnico de Bragança.

Paiva, J. (2007). Árvores e florestas de Portugal. Do castanheiro ao Teixo. As outras espécies florestais. Público, Volume 5. Lisboa.

Peever, T., Liu, Y.C., Cortesi, P. & Milgroom, M. (2000). Variation in Tolerance and Virulence in the Chestnut Blight Fungus-Hypovirus Interaction. Applied and environmental microbiology. Vol. 66. Nº11. pp. 4863-9.

Pereira, E., Rigling, D., Prospero, S. & Gouveia, E. (2015). Controlo biológico do cancro do castanheiro. Detecção, identificação e caracterização do Hypovirus - CHV1. Revista de Ciências Agrárias, 38 (2), 258-263.

Peters, F. S., Bußkamp, J., Prospero, S., Rigling, D. & Metzler, B. (2014). Genetic diversification of the chestnut blight fungus *Cryphonectria parasitica* and its associated hypovirus in Germany. Fungal biology, 118, pp. 193-210.

Papazova-Anakieva, I., Sotirovski, K., Cortesi, P. & Milgroom, M.G. (2007). Horizontal transmission of hypoviruses between vegetative compatibility types of *Cryphonectria parasitica* in Macedonia. European Journal of Plant Pathology. V. 120:35-42.

Prospero, S., Conedera, M., Heiniger, U. and Rigling, D. (2006). Saprophytic activity and sporulation of *Cryphonectria parasitica* on dead Chestnut wood in forests with naturally established hypovirulence. Phytopathology, 96, 1337-1344.

Rice, A.V., Currah R.S. (2005). Profiles from Biolog FF plates and morphological characteristics support the recognition of *Oidiodendron fimicola* sp. nov. Studies in Mycology 53: 75–82.

Rigling, D. & Prospero, S. (2018). *Cryphonectria parasitica*, the causal agent of chestnut blight: invasion history, population biology and disease control. *Molecular Plant Pathology*, 19 (1), 7-20.

Robin, C. & Heiniger, U., (2001). Chestnut blight in Europe: Diversity of *Cryphonectria parasitica*, hypovirulence and biocontrol. *Forest Snow and Landscape Research*. 76, (3): 361-367.

Smith, A.R. (2013). Biological Control of *Cryphonectria parasitica* with *Streptomyces* and an Analysis of Vegetative Compatibility Diversity of *Cryphonectria parasitica* in Wisconsin, USA. University of Wisconsin-La Crosse.

Sotirovski, K., Papazova-Anakieva, I., Grünwald, N.J. & Milgroom, M.G. (2004). Low diversity of vegetative compatibility types and mating type of *Cryphonectria parasitica* in the southern Balkans. *Plant Pathology*, V. 53, 325-333.

Tardío, J., Pardo de Santayana, M., Morales, R., Molina, M. & Aceituno, L. (2018). Inventario Español De Los Conocimientos Tradicionales Relativos A La Biodiversidad Agrícola. Volumen 1. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Madrid. 420 pp.

Van Alfen, N.K., Jaynes, R.A., Anagnostakis, S.L. & Day, P.R. (1975) – Chestnut Blight – Biological control by transmissible hypovirulence in *Endothia parasitica*. *Science*, vol. 189, p. 890-891.

Vieira dos Santos, M.C., Horta, J., Moura, L., Pires, D.V., Conceição, I., Abrantes, I. & Costa, S.R. (2019). Na integrative approach for the selection of *Pochonia chlamydosporia* isolates for biocontrol of potato cyst and root knot nematodes. *Phytopathologia Mediterranea*, 58 (1): 187-199.

Zak, J.C., Willing, M.R., Moorhead, D.L. & Wildman, H.G., (1994). Functional diversity of microbial communities: a quantitative approach. *Soil Biol. Biochem.* 26, 1101–1108.

Zamora, P., Martín, A. B., Dueñas, M., San Martin, Martínez-Álvarez, P. & Diez, J. J. (2014). Control of chestnut blight by the use of hypovirulent strains of the fungus *Cryphonectria parasitica* in northwestern Spain. *Biological Control*. Vol. 79, Pages 58-66.

Zamora, P., Martín, A. B., San Martin, R. & Diez, J. J. (2015). *Cryphonectria parasitica* isolates of the same vegetative compatibility type display different rates of transfer of CHV1 hypovirus. *European Journal of Plant Pathology*. Vol. 143, Issue 4, pp 767-777.

ANEXOS

ANEXO I- Fontes de Carbono presentes nas Microplacas FF Biolog.

BIOLOG

Fungi Identification Test Panel

FF MicroPlate™

A1 Water	A2 Tween 80	A3 N-Acetyl-D- Galactosamine	A4 N-Acetyl-D- Glucosamine	A5 N-Acetyl-D- Mannosamine	A6 Adonitol	A7 Amygdalin	A8 D-Arabinose	A9 L-Arabinose	A10 D-Arabitol	A11 Arbutin	A12 D-Cellobiose
B1 α -Cyclodextrin	B2 β -Cyclodextrin	B3 Dextrin	B4 α -Erythritol	B5 D-Fructose	B6 L-Fucose	B7 D-Galactose	B8 D-Galacturonic Acid	B9 Gentiobiose	B10 D-Gluconic Acid	B11 D-Glucosamine	B12 α -D-Glucose
C1 Glucose-1- Phosphate	C2 Glucuronamide	C3 D-Glucuronic Acid	C4 Glycerol	C5 Glycogen	C6 m-Inositol	C7 2-Keto-D-Gluconic Acid	C8 α -D-Lactose	C9 Lactulose	C10 Maltitol	C11 Maltose	C12 Maltotriose
D1 D-Mannitol	D2 D-Mannose	D3 D-Melezitose	D4 D-Melibiose	D5 α -Methyl-D- Galactoside	D6 β -Methyl-D- Galactoside	D7 α -Methyl-D- Glucoside	D8 β -Methyl-D- Glucoside	D9 Palatinose	D10 D-Psicose	D11 D-Raffinose	D12 L-Rhamnose
E1 D-Ribose	E2 Salicin	E3 Sedoheptulosan	E4 D-Sorbitol	E5 L-Sorbose	E6 Stachyose	E7 Sucrose	E8 D-Tagatose	E9 D-Trehalose	E10 Turanose	E11 Xylitol	E12 D-Xylose
F1 γ -Amino-butiric Acid	F2 Bromosuccinic Acid	F3 Fumaric Acid	F4 β -Hydroxy-butiric Acid	F5 γ -Hydroxy-butiric Acid	F6 p -Hydroxyphenyl- acetic Acid	F7 α -Keto-glutaric Acid	F8 D-Lactic Acid Methyl Ester	F9 L-Lactic Acid	F10 D-Malic Acid	F11 L-Malic Acid	F12 Quinic Acid
G1 D-Saccharic Acid	G2 Sebacic Acid	G3 Succinamic Acid	G4 Succinic Acid	G5 Succinic Acid Mono-Methyl Ester	G6 N-Acetyl-L- Glutamic Acid	G7 Alaninamide	G8 L-Alanine	G9 L-Alanyl-Glycine	G10 L-Asparagine	G11 L-Aspartic Acid	G12 L-Glutamic Acid
H1 Glycyl-L-Glutamic Acid	H2 L-Ornithine	H3 L-Phenylalanine	H4 L-Proline	H5 L-Pyrogutamic Acid	H6 L-Serine	H7 L-Threonine	H8 2-Amino Ethanol	H9 Putrescine	H10 Adenosine	H11 Uridine	H12 Adenosine-5'- Monophosphate